

**Abordagens para a caracterização da atividade  
microbiana em solos sujeitos a diferentes práticas  
culturais no empreendimento hidroagrícola Brinches  
Enxoé**

**Eustáquius Fernando Miguel Nhime**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
ENGENHARIA AGRONÓMICA**

**Orientadoras:** Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Doutora Paula Maria da Luz Figueiredo de Alvarenga

**Júri:**

Presidente: Doutora Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira,  
Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de  
Lisboa.

**Vogais:**

Doutora Patrícia Alexandra Dias Brito Palma, Professora Adjunta do Instituto  
Politécnico de Beja- Escola Superior Agrária.

Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Técnica Superior do Instituto Superior  
de Agronomia da Universidade de Lisboa.

## **Agradecimentos**

A Deus pela oportunidade, cuidado e saúde que me concedeu durante esta jornada.

Às minhas Professoras e orientadoras, Dra. Mariana Mota e Dra. Paula Alvarenga, pela sapiência que me transmitiram, pela paciência, por suportarem as minhas insuficiências, incômodos e chatices com as minhas constantes ligações e emails enviados.

Ao Professor Dr. Amílcar Mateus de Oliveira Salumbo, pelos conselhos, disponibilidade, apoio moral, espiritual e psicológico, incentivos, paciência, confiança que tem depositado em mim. A tia Aldina Salumbo, pelo apoio moral e espiritual através das suas lindas mensagens de encorajamento, força, ânimo e com seu sorriso, simpatia e espírito de preocupação foi um grande suporte para a minha família durante a minha ausência. Ao Professor Alberto Sili e ao tio Abraão Muluzi, pelos ricos conselhos de encorajamento e perseverança que nos têm dado a mim e a minha família. Ao meu grande irmão Nino, não tenho palavras.

À Professora Dra. Imaculada Conceição, decana da Faculdade de Ciências Agrárias do Huambo, pela chance e oportunidade que me proporcionou.

A minha família (esposa e filha), Belmira Kawoli Wambo Miguel Nhime e Daniela Rosária Wambo Miguel Nhime, por terem aceite este desafio, mas, principalmente, pelo apoio incondicional em todos os momentos desta jornada e por suportarem dificuldades de vária índole durante este período.

Aos meus sogros e a minha mãe, não tenho palavras para expressar os meus agradecimentos, simplesmente digo muito obrigado. Aos meus familiares em geral, irmãos, tios e tias, sobrinhas e sobrinhos pelo apoio. Aos meus irmãos em Cristo, pelas orações, apoio espiritual a mim e à minha família.

Aos meus companheiros de Lisboa, que sempre estiveram disponíveis para me ajudar no que podiam. À minha querida amiga Eng.<sup>a</sup> Maria Margarida Bairrão e ao Eng.<sup>o</sup> Ailton Mandinga que não mediam esforço nem tempo para me ajudar sempre que eu solicitasse, à minha cara amiga e companheira de laboratório Neusa Semedo, pela ajuda, risadas, tristezas e desabafos. Às senhoras funcionárias do Laboratórios de Biologia Molecular e Micropropagação de Horticultura, do ISA (D. Luísa e a D Nídia), que, com muita simpatia, sempre estiveram disponíveis para nos auxiliar.

Ao coletivo de Professores e Funcionários do Instituto Superior de Agronomia, pelo carinho, atenção e tempo disponibilizado. Aos colegas de curso pelo apoio, à comunidade africana do ISA, pela amizade e partilha, e a todos que direta e indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse hoje uma realidade.

Muito obrigado.

## AGRADECIMENTO

Este estudo apresenta alguns resultados obtidos ao abrigo do Grupo Operacional FitoFarmGest (PDR2020-101-030926) “Gestão Sustentável de Produtos fitofarmacêuticos em Olival, Vinha e Culturas Arvenses, na Área de Influência do EFMA”, financiado pelo Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural.



PROGRAMA DE  
DESENVOLVIMENTO  
RURAL 2014-2020



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu Agrícola  
de Desenvolvimento Rural

*A Europa investe nas zonas rurais*

Este trabalho teve apoio financeiro, logístico e institucional do LEAF (Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem), suportado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (UID/AGR/04129/2013).

## Resumo

Nesta tese é apresentada a potencial influência de determinadas práticas culturais sobre um dos indicadores de qualidade do solo, a atividade microbiana, em diferentes parcelas com diferentes práticas culturais.

A atividade microbiana em solos agrícolas é crucial, devido ao papel fundamental dos microrganismos como agentes da mineralização de todos os materiais orgânicos que entram no solo e, portanto, na reciclagem dos principais nutrientes para o crescimento e desenvolvimento das plantas. A diversidade e atividade microbiológicas em terras aráveis serve como indicador de qualidade do solo, pois influenciam não apenas a fertilidade e estrutura dos solos agrícolas, mas também as funções dos ecossistemas. Este estudo caracterizou a atividade microbiana de bactérias e fungos, em quatro parcelas agrícolas localizadas no empreendimento hidroagrícola Brinches-Enxoé (Alqueva, Baixo Alentejo), através do plaqueamento, amplificação com *primers* específicos e a atividade enzimática da desidrogenase. Foram analisados solos de quatro parcelas: uma parcela de girassol (*Helianthus annuus* L.), habitualmente submetida a práticas de baixa aplicação de pesticidas e fertilização mineral, mobilização do solo e rotação de cultural, sendo as outras três parcelas ocupadas por vinhas (*Vitis vinifera*), de três produtores diferentes, sujeitas a uma aplicação diferenciada de pesticidas, adubação e aplicação de corretivos orgânicos.

Os solos analisados caracterizam-se por serem pouco alcalinos, com baixa salinidade, e teores de matéria orgânica que variam entre muito baixos a médios, um indicador da sua baixa fertilidade, apesar terem altos teores de  $P_2O_5$  e  $K_2O$  extraíveis. O nosso estudo revelou que as diferentes práticas culturais modificaram significativamente a atividade microbiológica nos solos das parcelas estudadas, tendo a atividade microbiana, em parte, aumentado no solo sob reduzida aplicação de produtos fitofarmacêuticos, rotação de cultura e aplicação de corretivos orgânicos, relativamente ao solo sob elevada aplicação de pesticidas e sem aplicação de corretivos orgânicos.

**Palavras chave:** qualidade do solo, avaliação da atividade microbiana do solo, manejo do solo (práticas culturais), PCR, reação em cadeia da DNA-polimerase.

## Abstract

This thesis presents the potential influence of certain cultural practices on one of the soil quality indicators, the microbial activity, in different agricultural fields, with different cultural practices.

Microbial activity in agricultural soils is crucial, due to the fundamental role of microorganisms as agents of mineralization of all organic materials entering the soil and, therefore, in the recycling of key nutrients for plant growth and development. The diversity and microbiological activity on arable land serves as an indicator of soil quality, as it influences not only the fertility and structure of agricultural soils, but also the functions of ecosystems.

This study characterized the microbial activity of bacteria and fungi, in the soils of four agricultural explorations located in the Brinches-Enxoé hydro-agricultural system (Alqueva, Baixo Alentejo) through plating, amplification with specific primers and dehydrogenase enzymatic activity. Soils from four plots were analysed: one with sunflower (*Helianthus annuus* L.), being usually subjected to practices of low pesticide application and mineral fertilization, soil mobilization and crop rotation, and the other three plots occupied by vineyards (*Vitis vinifera*), from three different producers, subject to differentiated application of plant protection products, fertilization and application of organic amendments.

The soils are characterized by being slightly alkaline, with low salinity, and organic matter levels ranging from very low to medium, an indicator of their low fertility, despite having high levels of extractable  $P_2O_5$  and  $K_2O$ . Our study evidenced that the different cultural practices significantly modified the microbiological activity in the soils of the studied plots, with the microbial activity increasing in the soil under reduced application of phytopharmaceuticals, crop rotation and application of organic amendments, relatively to the soil subjected to high application of plant protection products and without application of organic amendments.

**Keywords:** soil quality, evaluation of soil microbial activity, soil management (cultural practices), PCR, DNA polymerase chain reaction.

## Índice

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Objetivos</b>	<b>4</b>
1.1.1. Geral	4
1.1.2. Específicos	4
<b>2. ESTADO DA ARTE</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Avaliação da qualidade do solo</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Importância do carbono orgânico e dos microrganismos na fertilidade do solo</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Propriedades bioquímicas e microbiológicas na avaliação da qualidade do solo</b>	<b>9</b>
2.3.1. Abordagem molecular à caracterização da biomassa microbiana do solo	11
<b>2.4. Efeito das práticas agrícolas na qualidade do solo</b>	<b>13</b>
<b>2.5. Práticas agrícolas de reduzido impacto na qualidade do solo</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Caracterização das explorações agrícolas, culturas e práticas culturais</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Caracterização dos solos na área de estudo</b>	<b>28</b>
<b>3.3. Metodologias de avaliação da atividade biológica</b>	<b>28</b>
3.3.1. Atividade enzimática da desidrogenase	28
3.3.2. Contagem de colónias de microrganismos presentes nos solos	29
3.3.3. Preparação do meio de cultura para plaqueamento de extratos de solos	29
3.3.4. Inoculação e incubação de bactérias e fungos	30
3.3.5. Avaliação molecular da abundância relativa de genes específicos de fungos e bactérias	31
3.3.5.1. Protocolo de isolamento do DNA do solo	31
3.3.5.2. Quantificação do DNA extraído	33
3.3.5.2.1. Quantificação direta	33
3.3.5.2.2. Quantificação indireta	33

3.3.5.3.	PCR para bactérias.....	33
3.3.5.4.	PCR para fungos.....	34
<b>3.4.</b>	<b>Tratamento estatístico dos resultados .....</b>	<b>35</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.</b>	<b>Caracterização físico química dos solos nas diferentes parcelas .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2.</b>	<b>Atividade enzimática da desidrogenase .....</b>	<b>42</b>
<b>4.3.</b>	<b>Avaliação em placa das bactérias .....</b>	<b>44</b>
4.3.1.	Comparação das amostras entre si em placas de bactérias com 10 µl e 100 µl de extrato de solo.....	46
<b>4.4.</b>	<b>Avaliação em placa de fungos.....</b>	<b>49</b>
4.4.1.	Comparação das amostras entre si em placas de fungos com 10 µl e 100 µl de extrato de solo .....	49
<b>4.5.</b>	<b>Avaliação molecular .....</b>	<b>51</b>
4.5.1.	Avaliação da qualidade e quantidade do DNA do solo.....	51
4.5.2.	Avaliação molecular da presença de DNA bacteriano nos extratos de DNA dos solos amostrados por amplificação via PCR .....	53
4.5.3.	Avaliação molecular da presença de fungos por amplificação via PCR de fragmentos específicos de fungos a partir do extrato de DNA do solo .....	55
<b>4.6.</b>	<b>Comparação entre avaliação em placa e avaliação molecular de bactérias e fungos.....</b>	<b>57</b>
<b>4.7.</b>	<b>Comparação dos extratos de DNA das diferentes amostras.....</b>	<b>58</b>
<b>4.8.</b>	<b>Comparação entre a caracterização da atividade microbiana e atividade enzimática da desidrogenase.....</b>	<b>59</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO A -</b>	<b>Gráficos das leituras de absorvância dos extratos das amostras de solo (230-320 nm) .....</b>	<b>70</b>

## Índice de tabelas

<b>Tabela 2.1-</b> Classificação dos solos quanto à reação, ou seja pH(H <sub>2</sub> O) (LQARS, 2006). .....	6
<b>Tabela 2.2-</b> Classificação dos solos agrícolas quanto ao teor em matéria orgânica (LQARS, 2006). ....	7
<b>Tabela 2.3-</b> Classificação dos solos quanto aos teores de fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) e potássio (K <sub>2</sub> O) extraíveis pelo Método de Egner-Riehm (LQARS, 2006). ....	7
<b>Tabela 3.1-</b> Caracterização do itinerário dos produtos fitofarmacêuticos utilizados na parcela de girassol do produtor A (Fonte: Projeto Fitofarmgest). ....	19
<b>Tabela 3.2-</b> Caracterização do itinerário dos produtos fitofarmacêuticos utilizados na parcela de vinha do produtor A (Fonte: Projeto Fitofarmgest). ....	21
<b>Tabela 3.3-</b> Caracterização do itinerário dos produtos fitofarmacêuticos utilizados na parcela de vinha do produtor B (Fonte: Projeto Fitofarmgest). ....	20
<b>Tabela 3.4-</b> Caracterização do itinerário dos produtos fitofarmacêuticos utilizados na parcela de vinha do produtor C (Fonte: Projeto Fitofarmgest). ....	23
<b>Tabela 3.5-</b> Caracterização do itinerário da fertilização utilizada na parcela de girassol do produtor A (Fonte: Projeto Fitofarmgest). ....	24
<b>Tabela 3.6-</b> Caracterização do itinerário da fertilização utilizada na parcela de vinha do produtor A (Fonte: Projeto Fitofarmgest). ....	24
<b>Tabela 3.7-</b> Caracterização do itinerário da fertilização utilizada na parcela de vinha do produtor B (Fonte: Projeto Fitofarmgest). ....	25
<b>Tabela 3.8-</b> Caracterização do itinerário da fertilização utilizada na parcela de vinha do produtor C (Fonte: Projeto Fitofarmgest). ....	27
<b>Tabela 3.9-</b> Tabela resumo das práticas culturais submetidas nas diferentes parcelas .....	27
<b>Tabela 4.1-</b> Classificação da classe textural dos solos utilizados no estudo (Fonte: projeto Fitofarmgest). ....	36
<b>Tabela 4.2-</b> Matriz de correlações de Pearson (as correlações marcadas a vermelho são significativas a um nível de significância $\alpha=0,05$ ( $p < 0,05$ ; $n = 21$ )). ....	44
<b>Tabela 4.3 -</b> Contagem do número de colónias de bactérias que se desenvolveram em placas de LB com 10 e 100 $\mu$ l de extrato de solo, respetivamente, nas sete amostras analisadas. ....	46
<b>Tabela 4.4 -</b> Contagem do número de colónias de fungos que se desenvolveram em placas de PDA + 10 $\mu$ l/ml de canamicina com 10 e 100 $\mu$ l de extrato de solo, respetivamente, nas sete amostras analisadas. ....	49
<b>Tabela 4.5-</b> Razões dos valores de absorção de ácido húmico, DNA e proteína por espectrofotómetro. ....	52



## Índice de figuras

<b>Figura 3.1</b> - Localização das parcelas agrícolas avaliadas: A, B e C, todas situadas no empreendimento hidroagrícola Brinches-Enxoé, subsistema Ardila (Albufeira do Alqueva) (Fonte: Projeto Fitofarmgest). .....	18
<b>Figura 4.1</b> - Valores de pH nos diferentes locais (média $\pm$ desvio-padrão, $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD, $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest). .....	37
<b>Figura 4.2</b> - Valores de condutividade elétrica (CE) nos diferentes locais (média $\pm$ desvio-padrão, $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD, $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest).....	38
<b>Figura 4.3</b> - Teores em matéria orgânica (MO) nos diferentes locais (média $\pm$ desvio-padrão, $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD, $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest).....	39
<b>Figura 4.4</b> - Teores de azoto Kjeldahl ( $N_{Kj}$ ) nos diferentes locais (média $\pm$ desvio-padrão, $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD, $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest).....	40
<b>Figura 4.5</b> - Teores de fósforo extraível (Egner-Rhiem) nos diferentes locais (média $\pm$ desvio-padrão, $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD, $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest).....	41
<b>Figura 4.6</b> - Teores de potássio extraível (Egner-Rhiem) nos diferentes locais (média $\pm$ desvio-padrão, $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD, $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação	

cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest).....	41
<b>Figura 4.7-</b> Valores de atividade enzimática nos solos dos diferentes locais de amostragem (média $\pm$ desvio-padrão, n = 3). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD, $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest). ....	43
<b>Figura 4.8-</b> Crescimento de colônias de bactérias em placas de LB com 10 $\mu$ l de extrato de solo, após 24 h .....	45
<b>Figura 4.9-</b> Crescimento de colônias de bactérias em placas de LB com 100 $\mu$ l de extrato de solo, após 24 h .....	46
<b>Figura 4.10-</b> Número de colônias de bactérias obtidas em placas de LB, com 10 $\mu$ l de extrato de solo, para as sete amostras avaliadas, após 24 h. ....	48
<b>Figura 4.11-</b> Número de colônias de bactérias obtidas em placas de LB, com 100 $\mu$ l de extrato de solo, para as sete amostras avaliadas, após 24 h. ....	48
<b>Figura 4.12-</b> Número de colônias de fungos obtidas em placas de PDA, com 10 $\mu$ l de extrato de solo, com 10 $\mu$ l/ml de canamicina, após 24 h. ....	50
<b>Figura 4.13-</b> Número de colônias de fungos obtidas em placas de PDA + 10 $\mu$ l/ml de canamicina, com 100 $\mu$ l de extrato de solo, após 24 h de incubação.....	50
<b>Figura 4.14-</b> Observação do tamanho de DNAs, após a sua extração pelo protocolo de isolamento (Dneasy PowerSoil Kit), onde os extratos foram colocados a correr em gel de agarose a (1,2%), por ordem de produtores e na última pista M: Marcador $\lambda$ HindIII EcoRI.....	53
<b>Figura 4.15-</b> Produto amplificado do DNA genómico otimizado com primers de bactérias, onde os extratos de DNA estão organizados por ordem de produtores (A_V, A_G_1, A_G_2, A_G_3, B_V_1, B_V_2 e C_V), e na última pista M: Marcador GeneRuler 100pb Plus.....	55
<b>Figura 4.16-</b> Produto amplificado do DNA genómico otimizado com primers de fungos, onde os extratos de DNA estão organizados por ordem de produtores (A_V, A_G_1, A_G_2, A_G_3, B_V_1, B_V_2 e C_V), e na última pista M: Marcador GeneRuler 100pb Plus. ....	56
<b>Figura A.0.1-</b> Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra A_V ....	70
<b>Figura A.0.2-</b> Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da amostra A_V .....	70
<b>Figura A.0.3-</b> Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra B_V_1	71

<b>Figura A.0.4-</b> Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da B_V_1 .....	71
<b>Figura A.0.5-</b> Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra B_V_2	71
<b>Figura A.0.6-</b> Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da amostra B_V_2 .....	72
<b>Figura A.0.7-</b> Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra C_V ....	72
<b>Figura A.0.8-</b> Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da amostra C_V .....	72
<b>Figura A.0.9-</b> Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra A_G_1	73
<b>Figura A.0.10-</b> Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da A_G_1 .....	73
<b>Figura A.0.11-</b> Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra A_G_2 .....	73
<b>Figura A.0.12-</b> Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da amostra A_G-2 .....	74
<b>Figura A.0.13-</b> Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra A_G_3. ....	74
<b>Figura A.0.14-</b> Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da amostra A_G_3 .....	74

## Lista de abreviaturas

Amostras:

A\_V - Produtor A (vinha)

A\_G\_1 - Produtor A (girassol, ponto de amostragem 1)

A\_G\_2 - Produtor A (girassol, ponto de amostragem 2)

A\_G\_3 - Produtor A (girassol, ponto de amostragem 3)

B\_V\_1 - Produtor B (vinha, ponto de amostragem 1)

B\_V\_2 - Produtor B (vinha, ponto de amostragem 2)

C\_V - Produtor C (vinha)

CE – Condutividade elétrica

CTAB- Hexadeciltrimetilamónio

DGADR- Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural

DNA- Ácido desoxirribonucleico

FAO- Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

GPP- Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral

LB- Luria-Bertani (Meio de cultura para bactérias)

LQARS- Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva

MO- Matéria orgânica

ms – massa seca

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase (do Inglês *polymerase chain reaction*)

PDA- Meio dextrose e batata para cultura de fungos

PVPP- Polivinilpolipirrolidona

RNA- Ácido ribonucleico

SSSA- Soil Science Society of America

SOC- Carbono Orgânico do Solo

TPF- Trifenilformazan

TTC- 2,3,5-Trifeniltetrazólio

USDA- United States Department of Agriculture

UV- Radiação ultravioleta

% m/m – concentração expressa em percentagem mássica

# 1. INTRODUÇÃO

O solo é cada vez mais reconhecido como um recurso não renovável na escala de vida humana porque, uma vez degradado, a sua regeneração é um processo extremamente lento. É definido como a camada superficial da terra, amplamente complexo e variável, composto por matéria orgânica, elementos minerais, ar, água e organismos vivos como (minhocas, insetos, bactérias, fungos, algas e nematodes) (Bucella, 2015; Lal, 2015). Outros autores afirmam que o solo é um sistema vivo que presta serviços essenciais para a sobrevivência da sociedade e dos ecossistemas (Doran & Parkin, 1994; Brady & Weil, 2017).

Os solos desempenham seis papéis chave na provisão dos serviços dos ecossistemas: i) suportam o crescimento das plantas, por fornecerem suporte para as raízes das plantas e elementos nutritivos para a planta inteira; ii) regulam o ciclo hidrológico, ou seja, o armazenamento da água, a sua perda, utilização, contaminação e purificação são feitas no solo, ou através dele; iii) permitem a degradação/mineralização dos materiais orgânicos que chegam ao solo, efetuada pelos decompositores, o que permite a disponibilização dos elementos básicos essenciais às plantas; iv) contêm reserva genética, fornecendo habitat para os répteis, pequenos mamíferos, pequenos insetos e para uma numerosa diversidade de microrganismos; v) influenciam a composição da atmosfera e o clima, por absorverem e libertarem grandes quantidades de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e outros gases, contribuindo para a reflexão de parte da radiação solar que neles incide; e vi) desempenham um papel muito importante como suporte de infraestruturas (Brady & Weil, 2017).

O solo, como qualquer outro recurso, precisa de ser protegido de modo a garantir a sua sustentabilidade. A agricultura é uma das atividades humanas mais antigas e que maior área utiliza, podendo afetar as propriedades físico-químicas e microbiológicas (funcionais e estruturais). Segundo Tisdall & Oades (1982) e Lal (2018), a mobilização intensiva do solo, rega com água de má qualidade, algumas técnicas de rega (e.g., rega por aspersão), práticas de monocultura, e aplicação excessiva de produtos químicos (fertilizantes e produtos fitofarmacêuticos), entre outras, podem ser fatores determinantes na perda da qualidade do solo. O problema é agravado pelos numerosos processos pedogenéticos do solo (e.g., calcificação, ferruginização, ferralitização, alcalinização, gleização, salinização) e tipos de degradação do solo (física, química, biológica e ecológica). A má gestão das explorações agrícolas, florestas, e pastagens causa degradação generalizada da qualidade do solo pela erosão, levando à perda da

sua camada superficial. Outra causa de degradação generalizada é a acumulação de sais em solos irrigados com águas de má qualidade, o que é vulgar em regiões áridas. Por isso, no exercício da atividade agrícola é muito importante implementar práticas culturais adequadas de manejo ou uso do solo, para permitir a manutenção da sua qualidade e das suas propriedades (Girvan et al., 2003; Bloem, 2005; van Diepeningen et al., 2006).

Há uma forte necessidade de mudança deste paradigma, adotando medidas baseadas no Código de Boas Práticas Agrícolas ou nos princípios da Agricultura de Conservação. Na Agricultura de Conservação recomenda-se a manutenção duma cobertura permanente do solo com vegetação viva ou resíduos de culturas anteriores. Esta prática é essencial para a reposição de matéria orgânica e nutrientes do solo, contribuindo para a sua conservação.

Embora a proteção da qualidade do solo deva ser uma prioridade, muitas vezes é necessário tentar restaurar a qualidade dos solos já degradados. Alguns solos têm resiliência suficiente para se recuperarem quando sofrem degradação, mas, noutros casos, é necessário mais esforço para restaurar os solos degradados. Podem ter que ser aplicados corretivos orgânicos e inorgânicos, podem ter que ser cultivados, e pode ser necessário alterar o tipo de práticas agrícolas, ou, se os solos estiverem contaminados, os contaminantes podem ter que ser removidos (Brady & Weil, 2017).

Dada a importância dos solos para a produção agrícola e animal, bem como para o fornecimento de outros serviços do ecossistema, a nível local e global, a manutenção das boas condições do solo é de importância vital. Para gerir bem o uso de solos agrícolas, os tomadores de decisão precisam de ferramentas baseadas em ciência, de fácil aplicação e baixos custos, que lhes permitam avaliar as mudanças na qualidade e funções do solo (Bai et al., 2018). Um adágio popular chinês diz que “o solo é a mãe de todas as coisas”, sendo uma afirmação simples, que dá importância ao solo para a vida de todas os organismos, sendo as suas funções essenciais para a sustentabilidade no planeta (Doran & Parkin, 1994).

Em geral os solos reagem mais lentamente às mudanças no uso e manejo da terra do que a qualidade da água e do ar, e, por essa razão, pode ser mais difícil detetar mudanças na qualidade do solo antes que danos irreversíveis tenham ocorrido (Nortcliff, 2002). Por exemplo, a qualidade das águas superficiais e subterrâneas pode ser marcadamente afetada pelas práticas agrícolas, recebendo as águas de escorrência superficial e de lixiviação, o que pode levar à sua contaminação com nutrientes e pesticidas, mas a perda da qualidade do solo nem sempre é notada de uma forma tão marcada.

Neste enquadramento, está a ser desenvolvido o Projeto FITOFARMGEST – “Gestão sustentável de produtos fitofarmacêuticos, em olival, vinha e culturas arvenses, na área de influência do EFMA (Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva)”, coordenado pela Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja, no qual um dos objetivos consiste em “Identificar/determinar um grupo de indicadores biológicos e/ou físico-químicos de avaliação de uso sustentável de produtos fitofarmacêuticos, por forma, a melhorar a monitorização da sua utilização e garantir um melhor grau de proteção da população humana e dos ecossistemas”. Na avaliação da qualidade do solo são analisadas, habitualmente, as características físico-químicas relacionadas com a sua fertilidade, ou com a sua potencial contaminação. Porém, tem vindo a ser reconhecida a importância da integração de indicadores biológicos na avaliação dessa qualidade, nomeadamente recorrendo à avaliação da atividade enzimática nos solos, e à determinação da biomassa microbiana, em termos de quantidade e diversidade, utilizando diferentes abordagens.

Diversas metodologias estáticas estão disponíveis para estimar a biomassa microbiana do solo em termos da sua abundância. Estes métodos incluem os fisiológicos (e.g., incubação por fumigação e resposta respiratória induzida por substrato), análises bioquímicas (e.g., amonificação de arginina), quantidade de ATP presente no solo e contagens ou observações microscópicas diretas (Turco et al., 1994). Embora essas técnicas possam não ser absolutas, elas têm um papel importante na caracterização da população microbiana, sendo capazes de indicar diferenças na população microbiana entre diferentes solos, ou alterações que essa população possa sofrer num determinado solo, temporalmente, quando sujeito a diferentes práticas. Mais recentemente, a biologia molecular permitiu também, não só estimar a quantidade como a diversidade dessa mesma biomassa microbiana (Pennanen et al., 2001; Nair et al., 2014; Smets et al., 2016; Cheng et al., 2016; Zielinska et al., 2016; Verma et al., 2017).

Este projeto onde se integra este estudo é de grande dimensão, tendo sido selecionado para este trabalho apenas um número reduzido de variáveis de modo a avaliar a sua influência na atividade microbiana em solos sujeitos a diferentes práticas culturais. As parcelas agrícolas selecionadas situam-se no empreendimento hidroagrícola Brinches-Enxoé, subsistema Ardila (Albufeira do Alqueva), tendo sido selecionadas três parcelas com cultura permanente (vinha), de três explorações diferentes, sujeitas a diferentes práticas culturais, e uma parcela com rotação cultural de girassol/alho.

## 1.1. Objetivos

Para o presente trabalho foram definidos os seguintes objetivos:

### 1.1.1. Geral

- ✓ Avaliação de indicadores microbiológicos em solos sujeitos a diferentes práticas culturais/uso do solo.

### 1.1.2. Específicos

- ✓ Avaliação das propriedades físico-químicas dos solos associadas à sua fertilidade (e.g., pH, condutividade elétrica, teor matéria orgânica, N Kjeldahl, P e K extraíveis);
- ✓ Avaliação da carga microbiológica dos solos (bactérias e fungos), utilizando os processos de plaqueamento (contagem de colónias) e amplificação por PCR;
- ✓ Comparação dos resultados obtidos pelos métodos anteriores com outro indicador de atividade microbiana - atividade enzimática da desidrogenase – realizado nos mesmos solos;
- ✓ Inferir sobre o eventual impacto das práticas culturais a que foram submetidos estes solos nos indicadores microbiológicos avaliados.



## 2. ESTADO DA ARTE

### 2.1. Avaliação da qualidade do solo

Segundo Doran & Zeiss (2000), o *United States Department of Agriculture* (USDA, sem data) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (2008), a saúde ou qualidade do solo é definida como a capacidade contínua do solo funcionar dentro dos limites do uso da terra e dos ecossistemas para sustentar a produtividade biológica, manter e/ou melhorar a qualidade ambiental e promover a saúde dos animais, das plantas e do ser humano. Segundo Li et al. (2008), Brady & Weil (2017) e Bongiorno et al. (2019), a qualidade do solo reflete-se na combinação das suas propriedades físicas, químicas e biológicas e a manutenção da sua boa condição é importante para o desenvolvimento sustentável do ecossistema terrestre.

A qualidade do solo tem fortes implicações para a saúde humana, devido aos inúmeros serviços fornecidos pelos ecossistemas através do solo (por exemplo, alimentos para o homem e animais, fibras, moderação do clima através do ciclo do carbono (C), tampão para agentes poluentes, filtração e purificação da água, ciclos biogeoquímicos dos elementos essenciais). Por tudo isso, a qualidade do solo deve ser protegida ou restaurada para melhorar esses serviços (Graber et al., 1995; Abrahams, 2002; Lal, 2009; Robinson et al., 2012 citados por Lal, 2015).

O papel fundamental desempenhado pelos solos está intimamente ligado à saúde humana e animal, à qualidade do meio ambiente, e ao desempenho das atividades dos microrganismos do solo, que contribuem para a decomposição de materiais vegetais e animais que integram os diferentes ciclos biogeoquímicos, incluindo a fixação de N<sub>2</sub>, a formação da estrutura do solo e o destino dos materiais aplicados ao solo (Doran & Parkin, 1994).

Numa perspetiva agronómica, a fertilidade do solo está relacionada com: i) propriedades físicas (i.e., textura e estabilidade estrutural do solo, espessura efetiva do solo, densidade aparente, resistência à penetração, condutividade hidráulica, porosidade, agregação, infiltração e capacidade de retenção de água); ii) propriedades químicas (i.e., pH, teores de matéria orgânica, macronutrientes principais e secundários, micronutrientes, capacidade de troca catiónica, condutividade elétrica, sodicidade, salinidade, disponibilidade de N, P e K); e iii) propriedades biológicas (i.e., mesofauna, taxa de mineralização do N, biomassa microbiana, respiração do solo, atividades enzimáticas) (Bünemann et al., 2018).

As propriedades físicas, como sejam a densidade, a textura e a estrutura influenciam o seu arejamento, permeabilidade, infiltrabilidade e capacidade de retenção de água. Por

outro lado, as propriedades químicas estão relacionadas com as concentrações dos constituintes orgânicos e inorgânicos que determinam características como sejam a fertilidade do solo, atividade biológica, grau de poluição, salinidade e corrosividade.

Algumas dessas propriedades, como a textura e a composição mineral, ajudam a definir um tipo específico de solo e são propriedades inerentes ao solo (estáticas), ou seja, são relativamente resistentes às práticas do manejo do solo (i.e., estáveis), enquanto outras propriedades do solo, como a estrutura, pH, teor em matéria orgânica e nutrientes essenciais, bem como as propriedades biológicas, podem ser significativamente alteradas pelo manejo do solo. Essas propriedades mais suscetíveis do solo podem indicar a sua qualidade em relação ao seu potencial agronómico (Schwilch et al., 2016; Brady & Weil, 2017).

Normalmente, para a classificação de um solo e avaliação da sua qualidade utilizam-se algumas das suas propriedades químicas, podendo a sua classificação ser feita de acordo com manuais de fertilidade do solo preparados para serem utilizados pelos agricultores, como o “Manual de Fertilização das Culturas”, do Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (LQARS, 2006). Por exemplo, é possível classificar o solo relativamente à sua reação (Tabela 2.1), teor em matéria orgânica (Tabela 2.2) e teor em P e K extraíveis (Tabela 2.3), o que permite dar ideia da sua qualidade agronómica.

**Tabela 2.1-** Classificação dos solos quanto à reação, ou seja  $pH(H_2O)$  (LQARS, 2006).

$pH(H_2O)$	Designação do solo
$\leq 4,5$	Muito ácido
4,6 a 5,5	Ácido
5,6 a 6,5	Pouco ácido
6,6 a 7,5	Neutro
7,6 a 8,5	Pouco alcalino
8,6 a 9,5	Alcalino
$> 9,5$	Muito alcalino

**Tabela 2.2-** Classificação dos solos agrícolas quanto ao teor em matéria orgânica (LQARS, 2006).

% matéria orgânica		Classificação
Solos textura grosseira	Solos de textura média ou fina	
≤ 0,5	≤1,0	Muito baixa
0,6 – 1,5	1,1 – 2,0	Baixa
1,6 – 3,0	2,1 – 4,0	Média
3,1 – 4,5	4,1 – 6,0	Alta
> 4,5	> 6,0	Muito alta

**Tabela 2.3-** Classificação dos solos quanto aos teores de fósforo ( $P_2O_5$ ) e potássio ( $K_2O$ ) extraíveis pelo Método de Egner-Riehm (LQARS, 2006).

Teores de $P_2O_5$ ou de $K_2O$ (mg/kg)	Classes de fertilidade
≤ 25	Muito baixa
26 – 50	Baixa
51 – 100	Média
101 – 200	Alta
> 200	Muito alta

De acordo com Islam & Weil (2000), a avaliação da qualidade do solo através das suas propriedades mais estáveis, que são relativamente insensíveis às práticas de manejo/uso agrícola do solo, não se alterando facilmente, fornecem pouca indicação de alterações a longo prazo. De acordo com os mesmos autores, essa não é a abordagem mais correta, devendo também utilizar-se indicadores mais sensíveis na avaliação da sua qualidade, como sejam as propriedades biológicas. Porém, segundo Parr et al. (1992), citados por Yakovchenko et al. (1996), as propriedades biológicas têm recebido menos ênfase do que as propriedades químicas e físicas na caracterização da qualidade do solo, porque seus efeitos são mais difíceis de medir ou prever, devendo-se inverter essa tendência.

## **2.2. Importância do carbono orgânico e dos microrganismos na fertilidade do solo**

Estudos de vários autores afirmam que a qualidade do solo é, principalmente, uma função do carbono orgânico do solo (SOC), sendo a sua disponibilidade um indicador-

chave da qualidade do solo e um importante impulsionador da sustentabilidade agrícola (Lal & Kimble, 1997; Lal, 2015; Mangalassery et al., 2015; Bongiorno et al., 2019). Além do teor em carbono orgânico, a sua distribuição em profundidade, juntamente com a rotatividade e o tempo médio de permanência, são componentes críticos da qualidade do solo e que permitem o bom desempenho das suas funções.

O carbono orgânico do solo (SOC), está relacionado com o seu teor em matéria orgânica (MO), que compreende todos os resíduos de plantas e animais, desde os resíduos mais recentes até aos resíduos mais intensamente humificados. Constitui um fator chave na fertilidade do solo, devido à sua posição crucial nos ciclos biogeoquímicos, sob a influência da biota do solo, funcionando como sumidouro e fonte de nutrientes para as plantas e energia para os organismos do solo (Marinari et al., 2006; Manlay et al., 2007; Brookes et al., 2008). A decomposição microbiana envolve a conversão da matéria orgânica do solo, durante a qual a biomassa de origem animal, vegetal ou microbiana pode ser convertida em moléculas orgânicas mais estáveis, transformada em sais minerais e libertada para a atmosfera sob a forma de CO<sub>2</sub> ou CH<sub>4</sub> (Oades, 1988; Haney et al., 2008). A matéria orgânica do solo é a base para solos saudáveis e produtivos e tem um efeito fundamental em quase todas as propriedades do solo, embora geralmente esteja presente em quantidades relativamente pequenas. A quantidade de matéria orgânica em qualquer solo particular é o resultado de uma ampla variedade de influências naturais, como o clima e a textura do solo, mas sofre também influências humanas que concorrem para a sua diminuição, principalmente em solos de agroecossistemas (Magdoff & van Es, 2000).

O teor de MO do solo é muito influenciado pelas práticas culturais utilizadas, uma vez que o seu teor depende de um equilíbrio entre as suas entradas (*inputs*: resíduos de plantas e animais, produto da sua decomposição por microrganismos heterotróficos, biomassa microbiana e corretivos orgânicos aplicados pelo agricultor) e as suas perdas (*outputs*: lixiviação de matéria orgânica solúvel, emissão de gases (CO<sub>2</sub> ou CH<sub>4</sub>), erosão, queimadas, remoção dos resíduos das culturas, mobilização intensiva). Este equilíbrio é perdido devido às diferenças entre os *inputs* de MO, que tendem a ser reduzidos em práticas de agricultura intensiva, e a sua taxa de mineralização, que pode ser elevada, e que é bastante afetada pelo clima da região, propriedades químicas e biofísicas do solo (Lal & Kimble, 1997; Magdoff & van Es, 2000; Sainjul et al., 2006; West & Six, 2007; Bhattacharyya et al., 2009).

O sequestro de carbono em áreas agrícolas tem sido sugerido para a melhoria da qualidade dos solos e, também, como uma estratégia para mitigar as emissões de gases com efeito estufa, como o CO<sub>2</sub> ou CH<sub>4</sub>. As práticas agrícolas que visam aumentar a MO no solo, que normalmente são adotadas na designada Agricultura de Conservação,

passam por implementar práticas de mobilização reduzida, ou mesmo de sementeira direta, pelo uso de culturas de cobertura durante todo o ano, pelo aproveitamento e incorporação no solo dos resíduos das culturas anteriores, ou pela aplicação de corretivos orgânicos ao solo (Brookes et al., 2008; Lal, 2016).

O armazenamento do carbono no solo é, pois, determinado pelo balanço entre a entrada no solo de resíduos orgânicos das plantas e pelos processos de decomposição microbiana. Dessa forma, pode ser avaliado o impacto das práticas de manejo do solo na dinâmica do carbono do solo através da avaliação da existência de microrganismos e da atividade microbiana no solo (Haney et al., 2008b citado por Haney et al., 2018; Yakovchenko et al., 1996; Bai et al., 2018).

### **2.3. Propriedades bioquímicas e microbiológicas na avaliação da qualidade do solo**

Segundo a FAO (2008), os solos de boa qualidade geralmente mantêm uma comunidade diversificada de organismos vivos que proporcionam inúmeros serviços essenciais, incluindo a libertação de nutrientes sob formas que podem ser utilizadas pelas plantas e outros organismos, a purificação da água através da remoção de contaminantes e organismos patogénicos, ajudam a controlar doenças de plantas, pragas de insetos e ervas daninhas, formam associações simbióticas benéficas com as raízes de plantas, reciclam os nutrientes essenciais das plantas, melhoram a estrutura do solo com repercussões positivas para a capacidade de retenção de água e nutrientes do solo e, finalmente, melhoram a produção agrícola.

As atividades microbianas no solo são reguladas por vários fatores, incluindo a temperatura, condições de humidade, arejamento, quantidade e qualidade de elementos nutritivos disponíveis, competição e antagonismo que ocorre entre os vários grupos de microrganismos, entre outros (Costa, 1975; Schlöter et al., 2003; Brady & Weil, 2017).

Um solo saudável é considerado biologicamente ativo e contém uma seção transversal estável de microrganismos do solo, que incluem várias espécies de animais vertebrados (camundongos, esquilos, cobras), meia dúzia de espécies de minhocas, 20 a 30 espécies de ácaros, 50 a 100 espécies de insetos (colêmbolos, besouros, formigas), dezenas de espécies de nematodos, centenas de espécies de fungos e talvez milhares de espécies de bactérias e actinomicetes. As bactérias representam o grupo mais numeroso, desempenhando um papel muito importante na decomposição e transformação de compostos no solo, quer estes sejam de origem natural ou de origem antropogénica (Pierzynski et al., 1994; Doran & Parkin, 1994; Brady & Weil, 2017).

A avaliação da qualidade de um solo deverá, por isso, contemplar a caracterização da sua atividade microbiológica, podendo esta ser estimada com recurso à quantificação da biomassa microbiana, à determinação da atividade bioquímica relacionada com os ciclos dos nutrientes, à medição da atividade enzimática de determinadas enzimas específicas que estão envolvidas nos ciclos do C, entre elas as amilases (EC 3.2.1.), celulasas (EC 3.2.14), lípases (EC 3.1.1.3),  $\beta$ -glucosidases e invertases; nos ciclos do N entre elas as proteases, amidases, ureases e deaminases; nos ciclos do P entre elas as fosfatases e nos ciclos do S entre elas as arilsulfatases (Dick, 1994; Gil-Sotres et al., 2005; Alvarenga, 2009), ou, atualmente, recorrendo a técnicas mais avançadas de biologia molecular, que recorrem à extração do DNA e sua avaliação em termos de quantidade e diversidade genética (Pennanen et al., 2001; , Nair et al., 2014; Smets et al., 2016; Cheng et al., 2016; Zielinska et al., 2016; Verma et al., 2017).

Gil-Sotres et al. (2005), classificam os parâmetros bioquímicos em dois grandes grupos: parâmetros bioquímicos gerais (e.g., C na biomassa microbiana, atividade da desidrogenase, potencial de mineralização do azoto) e parâmetros bioquímicos específicos (e.g., atividade das enzimas hidrolíticas).

As enzimas do solo jogam um importante papel na ecologia microbiana do solo catalisando inúmeras reações no solo. A maioria delas encontra-se ativa nas células vivas, as chamadas enzimas intracelulares. Porém, tanto os microrganismos como as plantas excretam um determinado número de enzimas para o solo, as chamadas enzimas extracelulares, as quais promovem a transformação de muitos dos compostos que não conseguem atravessar a membrana celular microbiana. Estas enzimas extracelulares (exoenzimas) sofrem degradação no solo, mas a sua adsorção aos minerais de argila pode estabilizá-las. Das várias exoenzimas que têm sido utilizadas na avaliação da qualidade bioquímica de solos destacam-se a  $\beta$ -glucosidase, as fosfatases (ácidas e alcalinas), as celulasas, as proteases, e a urease (Dick, 1994; Alvarenga, 2009).

A atividade da desidrogenase é um indicador de atividade biológica, pois, é, normalmente, imputada a um grupo de enzimas intracelulares que transferem hidrogénio e eletrões das moléculas dos substratos para aceptores apropriados, durante as fases iniciais da oxidação dos compostos orgânicos. Os eletrões são transferidos ao longo da cadeia de aceptores eletrónicos até ao oxigénio, que desempenha o papel de aceitador final de eletrões, levando à formação de água (Alvarenga, 2009; Campos et al., 2019).

Claramente, as enzimas intracelulares desempenham um papel importante nos processos vitais dos microrganismos no solo uma vez que a sua atividade está

intimamente ligada à atividade da célula de organismos viáveis e a medição da sua atividade tem sido considerada um bom indicador geral da atividade microbiana no solo, tendo sido utilizada na avaliação da sua qualidade (Alvarenga, 2009).

### 2.3.1. Abordagem molecular à caracterização da biomassa microbiana do solo

Já foi mencionado que o solo é o principal reservatório de microrganismos, abrigando uma vasta diversidade de espécies, mas a grande proporção desta população microbiana não é cultivável em meio de cultura. Com base nas estimativas atuais, a quantidade de microrganismos analisados no ambiente não ultrapassa os 1% do total, o que demonstra o papel essencial de técnicas independentes de avaliação, como a análise microbiana baseada em DNA, revolucionando a microbiologia ambiental presente e futura. Esta análise, baseada na extração de DNA, sua amplificação via PCR com *primers* específicos, e identificação dos microrganismos de origem através da sua sequenciação, assume assim um papel muito relevante neste esforço de avaliação das características microbiológicas como indicador da qualidade do solo (Lakay et al., 2006; Hamedi, 2016; Satyanarayana et al., 2017).

Considerando as dificuldades de estudar os microrganismos incultiváveis, bem como a incapacidade de detetar com precisão as espécies presentes numa amostra ambiental através de métodos tradicionais, que dependem da identificação física e contagem de espécies visíveis, é muito limitada a nossa capacidade de monitorizar a biodiversidade nos solos e contribuir para a sua conservação. Nos últimos anos, a análise de comunidades microbianas do solo foi promovida com o advento de tecnologias avançadas de biologia molecular, nomeadamente extração de DNA, amplificação por reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) e sequenciação. A extração do DNA total do solo é geralmente uma etapa crucial neste processo. A introdução de protocolos específicos e procedimentos otimizados aumentaram os níveis de precisão, além da relação custo-benefício da extração de DNA e da amplificação via PCR. As técnicas moleculares permitem a extração de representantes de ácidos nucleicos de comunidades microbianas inteiras de amostras ambientais, fornecendo uma abordagem útil e confiável para os estudos sobre microbianos incultiváveis em todo o mundo (Lakay et al., 2006; Hamedi, 2016; Satyanarayana et al., 2017). A aplicação de técnicas moleculares em microbiologia ambiental fornece novas ideias sobre as comunidades microbianas. No entanto, a extração e purificação eficientes de ácidos nucleicos da comunidade inteira continua a ser um grande desafio (Miller, 2001, citado por Lakay et al., 2006).

Hoje, existem várias técnicas padronizadas de extração de DNA do solo que incluem a lise direta, batimento de esferas, moenda com azoto líquido, aplicação de ultrassons, tratamento com detergente a quente ou o uso de fortes agentes caotrópicos, como sais de guanidínio e alta concentração de tratamento de lisozima (Satyanarayana et al., 2017).

Outras abordagens recorrem a *kits* já comercializados, que são rápidos, simples e eficazes para a extração do DNA do solo, sendo exemplos o *kit* Fast DNA® SPIN para solo (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EUA), e o *kit* de Isolamento de DNA PowerSoil® (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) e o E.Z.N.A® Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, EUA). No entanto, os kits podem ser caros, com desempenho variável e as receitas dos reagentes no *kit* permanecem desconhecidas, inviabilizando a sua preparação laboratorial a partir de cada um dos reagentes que o compõem (Cheng et al., 2016).

Uma dificuldade acrescida no isolamento do DNA do solo resulta também na co-extração de contaminantes, onde os mais comuns incluem os ácidos húmicos, polissacarídeos ou ureia, os quais interferem na detenção e medição do DNA. O ácido húmico é considerado o principal agente inibidor nos estudos ambientais de DNA e geralmente é co-extraído com o DNA devido à sua analogia físico-química com os ácidos nucleicos, tornando-o resistente e difícil de separar do DNA por causa das suas propriedades químicas. Consequentemente, eles não são completamente removidos durante os protocolos clássicos de extração, como o fenol-clorofórmio e os tratamentos com detergente e protease, permanecendo como contaminantes nas preparações finais de DNA (Moreira, 1998). A contaminação com ácidos húmicos restringe a atividade da Taq DNA polimerase durante a amplificação de genes por PCR, ou seja, a PCR pode ser completamente bloqueada por apenas 10 ng de contaminantes, embora o uso de métodos de reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR, do Inglês *polymerase chain reaction*) signifique que um alto rendimento de DNA não seja um requisito condicionante para abordagens moleculares (Hamedi, 2016; Zhou et al., 1996 citados por Satyanarayana et al., 2017; Rogers & Bendich, 1994 citado por Hermans et al., 2018). A remoção de substâncias húmicas, e outros contaminantes, de amostras de DNA do solo é um pré-requisito para analisar as comunidades microbianas do solo pelas técnicas moleculares. Os contaminantes podem ser removidos antes, durante ou depois da extração do DNA. A eliminação de contaminantes húmicos durante a extração de DNA tem sido um foco importante da pesquisa, porque os contaminantes podem inibir as aplicações a jusante. Contaminantes húmicos podem produzir complexos covalentes entre ácidos húmicos e DNA ou proteínas. Grupos fenólicos de ácidos húmicos podem combinar-se com grupos amino, levando à desnaturação de macromoléculas biológicas



ou formação de quinonas (Cheng et al., 2016). Vários métodos de purificação também foram avaliados para remover o ácido húmico do DNA do solo. Alguns deles incluem o uso de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), gradientes de densidade de cloreto de cério, polivinilpolipirrolidona (PVPP), várias resinas de filtração em gel e cromatografia de troca iônica e exclusão por tamanho (Zhou et al., 1996 citados por Lakay et al., 2006). Etapas adicionais na extração e purificação de DNA são demoradas e caras e a purificação rigorosa das amostras às vezes pode causar a perda do DNA. Adicionalmente, a padronização das técnicas de extração de DNA da microbiota do solo tem as suas próprias limitações, devido à natureza diferente dos solos e à complexidade dos ecossistemas (Cheng et al., 2016; Satyanarayana et al., 2017). Segundo Roose-Amsaleg et al. (2001), a eficiência da extração microbiana do DNA do solo depende da qualidade do solo, particularmente do tipo de argila e do teor de matéria orgânica, porque microrganismos podem interagir com coloides do solo, como agregados argila-orgânicos.

Considera-se que os extratos contêm DNA genômico suficientemente puro se tiverem uma razão de  $A_{260} / A_{280}$  nm entre 1,8 e 2,0, em que  $A_{260}$  e  $A_{280}$  representam as absorvâncias das amostras obtidas a 260 e 280 nm, respectivamente. Razões fora deste intervalo indicam que existem proteínas e fenóis entre os contaminantes presentes. O espectrofotômetro permite estimar o teor de ácidos húmicos que coexiste com os ácidos nucleicos (Hermans et al., 2018). Segundo Sambrook et al. (1989), citados por Satyanarayana et al. (2017), no espectrofotômetro, os ácidos húmicos absorvem radiação a 230 nm; o DNA a 260 nm e as proteínas e fenóis a 280 nm.

Ultrapassada a extração de DNA, a amplificação via PCR com *primers* específicos dos diferentes grupos de microrganismos (Sagar et al., 2014; Tanveer et al., 2016), e subsequente sequenciação dos fragmentos específicos amplificados, permite, de uma forma expedita, estimar a abundância relativa dos diferentes microrganismos na comunidade microbiana do solo (Smets et al., 2016).

## **2.4. Efeito das práticas agrícolas na qualidade do solo**

Segundo Bucella (2015), as práticas de manejo de solos agrícolas são um elemento-chave para o equilíbrio global do carbono orgânico do solo (SOC), sendo este um dos principais indicadores de qualidade e fertilidade do solo.

O carbono orgânico do solo (SOC), e as propriedades biológicas estão bem correlacionados com as funções benéficas do solo e dos ecossistemas, incluindo o armazenamento de água, a decomposição dos resíduos orgânicos e ciclos de nutrientes, a detoxificação de poluentes, a supressão de organismos nocivos e

patogénicos. Estes factos ilustram também a cadeia de causa e efeito que liga as decisões de manejo da terra à produtividade e à saúde das plantas e animais. É importante não apenas identificar os indicadores biofísicos mais apropriados, mas também garantir que os agricultores possam entender e relacionar facilmente esses indicadores, para que possam ser usados na tomada de decisão das práticas agrícolas a adotar (Schwilch et al., 2016; Brady & Weil, 2017; Bai et al., 2018).

Os solos podem regular e suprimir, até certo ponto, as pragas e doenças que os atingem, uma capacidade que é altamente desejável no desenvolvimento de sistemas de cultivo robustos, com uma menor dependência do controlo químico das pragas e doenças. Esta capacidade geral do solo para suprimir microrganismos patogénicos, pragas e doenças, está relacionada com a biomassa existente nesse solo, com a sua atividade, e, particularmente, com as suas propriedades microbiológicas, desempenhando um papel crucial nessa supressão. Esta baseia-se na capacidade coletiva do microbioma do solo e da rizosfera para competir e ser antagónicos aos organismos patogénicos (Janvier et al., 2007; Schlatter et al., 2017). Em contraste, essa capacidade de supressão do solo pode ser influenciada pelas práticas agrícolas, tanto a curto como a longo prazo, através dos seus efeitos nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Sánchez-Moreno & Ferris, 2007).

De acordo com Sinsabaugh (2010), as práticas de manejo agrícola afetam a composição e a atividade da comunidade microbiana do solo uma vez que podem levar à diminuição do teor em matéria orgânica e nutrientes do solo. Estas alterações na composição da comunidade microbiana têm implicações importantes para o funcionamento do solo, uma vez que diferentes grupos microbianos produzem diferentes enzimas que estão envolvidas no ciclo do carbono, bem como de outros elementos essenciais, como N e P. Por exemplo: a  $\beta$ -glucosidase e a celulase são enzimas importantes para a decomposição da fração disponível do tecido vegetal, enquanto enzimas oxido-redutoras, como fenol-oxidase e peroxidase, contribuem para a degradação da lignina, humificação e mineralização da matéria orgânica do solo. Os microrganismos do solo adaptam-se às condições artificiais criadas nos ecossistemas agrícolas pelas diferentes práticas adotadas, sendo que algumas dessas práticas levam a alterações consideráveis nessas comunidades. Mudanças no uso da terra forçam os microrganismos do solo a reestruturar as suas comunidades de acordo com as novas condições. Essas mudanças na biomassa microbiana do solo podem levar a mudanças em importantes funções do solo, como sejam a decomposição da matéria orgânica e ciclos biogeoquímicos de elementos essenciais. Como os microrganismos são seres vivos, respondem mais rapidamente às alterações das condições do solo do que o seu teor em matéria orgânica (Brookes et al., 2008; Sardans et al., 2008; Truu, 2008).

Existe um conjunto de práticas agrícolas que afetam especificamente a biomassa microbiana do solo e sua atividade. Solos onde são seguidas as principais regras da agricultura de conservação (e.g. mobilizações reduzidas, adubações orgânicas, rotações culturais, cultivo de leguminosas), são caracterizados por apresentarem maior diversidade microbiana e maiores atividades do que os solos onde se utilizam práticas de agricultura convencional (e.g. mobilização intensiva, adubações minerais, aplicação de produtos fitofarmacêuticos). Estas práticas de agricultura convencional tendem, a longo prazo, a reduzir a biomassa microbiana do solo e, conseqüentemente, a sua atividade (Truu, 2008).

Por isso, para avaliar a sustentabilidade das práticas agrícolas, é necessário avaliar a saúde ou qualidade dos solos, devendo ser utilizados parâmetros físicos, químicos e biológicos (Doran & Zeiss, 2000; Bongiorno et al., 2019).

Desta forma, propriedades microbiológicas, como por exemplo as atividades enzimáticas, têm sido utilizadas como indicadores de qualidade do solo, porque os microrganismos do solo são o segundo agente biológico mais importante, a seguir às plantas, no ecossistema agrícola (Yakovchenko et al., 1996; Doran & Zeiss, 2000; Kandeler et al., 1999 citados por Merelo et al., 2011).

No entanto, sabe-se que as respostas funcionais microbianas do solo podem variar sazonalmente, por isso, estudos incluindo amostragens ao longo das estações do ano, e em anos sucessivos, são necessários para investigar melhor as ligações entre os sistemas de cultivo e o comportamento das comunidades microbianas a longo prazo (Nivelle et al., 2016).

## **2.5. Práticas agrícolas de reduzido impacto na qualidade do solo**

Existem diferentes medidas ou técnicas com reduzido impacto agrícola que podem aumentar o armazenamento do carbono orgânico do solo (SOC), na camada superficial, e conseqüentemente, melhoram a sua qualidade e sustentam o funcionamento do solo. Nestas práticas de Agricultura de Conservação estão contempladas a utilização integrada de nutrientes (reciclagem de resíduos da exploração), a mobilização mínima, a sementeira direta, a proteção dos solos com coberturas vivas e/ou resíduos de culturas, a consorciação de culturas, a manutenção e/ou reforço da matéria orgânica, as siderações, a restrição da realização de queimadas, o uso racional de pesticidas e a fertilização mineral, a eliminação do pousio dos solos, o pastoreio controlado com taxas de uso apropriadas e a adoção de técnicas de irrigação de reduzido impacto (Smith & Conen, 2004 citados por Hermle et al., 2008; Ernst & Ermmeling, 2009; Lal, 2015).

Estas práticas agrícolas alternativas, são geralmente empregues para reduzir os efeitos negativos da agricultura intensiva na fertilidade e produtividade do solo, sabendo-se que essas práticas melhoram as relações ecológicas entre as plantas, solo e microrganismos (Marinari et al., 2006).

A redução da perturbação do solo, i.e., mobilização reduzida e sementeira direta, são práticas com um impacto direto na melhoria da qualidade do solo, porque preservam, sobretudo, a sua integridade biológica. A atividade microbiana afeta fortemente a dinâmica do carbono no solo. Os fungos do solo desempenham um papel importante na decomposição da matéria orgânica do solo, e a gradagem e mobilização do solo afetam intensamente os fungos do solo e outros microrganismos. Além disso, a biomassa do solo, juntamente com a matéria orgânica, controla a agregação e a estabilidade dos agregados no solo, contribuindo para a redução dos processos erosivos de perda de solo (Lal, 2018).

As práticas de Agricultura de Conservação aumentam o teor de carbono orgânico na camada superficial do solo, melhorando a agregação do solo e preservando os recursos do solo, permitindo o bom desempenho das suas funções (Six et al, 1998; Sainjul et al, 2006; Melero et al., 2009; López-Bellido et al., 2010; Coulombe et al., 1996 citados por Merelo et al., 2011).

O coberto vegetal contínuo do solo e a incorporação dos resíduos de culturas anteriores (cobertura do solo), são necessários para prevenir a diminuição do carbono e azoto do solo e para manter a diversidade e o funcionamento das populações microbianas (Nivelle et al., 2016).

A redução da intensidade e frequência das operações de mobilização do solo, da passagem das máquinas para aplicação de adubos e tratamentos fitossanitários, bem como o pastoreio controlado, colaboram para a descompactação do solo, permitindo aumentar a porosidade e estabilidade dos agregados do solo e, deste modo, melhorar o arejamento, a infiltração, retenção e drenagem de água, a germinação das sementes e o crescimento das raízes, aumentando a biodiversidade do solo e diminuindo o escoamento superficial (DGADR, 2017).

De acordo com Doran & Parkin (1994), Mbuthia et al., (2015) e DGADR (2017), as práticas de Agricultura de Conservação são práticas frequentemente associadas a uma maior quantidade de biomassa e de atividade microbiana, que estão ligadas a melhorias na qualidade do solo e na sua sustentabilidade. Segundo os mesmos autores o manejo do solo é sustentável somente quando mantém, ou melhora, a qualidade dos recursos, especificamente a qualidade dos recursos do ar, solo, água e alimentos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Caracterização das explorações agrícolas, culturas e práticas culturais

As parcelas utilizadas no estudo situam-se no empreendimento hidroagrícola Brinches-Enxoé, subsistema Ardila (Albufeira do Alqueva). O regime hidrológico na região do Alqueva reflete a expressão regional do clima mediterrânico, caracterizado por verões secos e quentes e invernos amenos e húmidos, com chuvas concentradas num curto período de tempo, durante o inverno (Morales, 1993; Palma et al., 2014).

Foram selecionadas três parcelas com cultura permanente (vinha, V), de três produtores diferentes (A, B e C, utilizando-se esta codificação de modo a preservar o anonimato dos produtores), sujeitas a diferentes práticas culturais, e uma parcela com rotação cultural de girassol/alho (G) do produtor A (Figura 3.1). Os solos foram amostrados na profundidade 0-20 cm. Dependendo da dimensão da parcela utilizada no estudo, o número de amostras recolhidas foi diferente, tendo-se recolhido uma amostra composta por cada 5 ha, aproximadamente: no produtor A, uma amostra de solo de vinha (A\_V), e três amostras de solo da rotação cultural girassol/alho (A\_G\_1, A\_G\_2 e A\_G\_3), do produtor B, duas amostras de solos de vinha (B\_V\_1 e B\_V\_2), e do produtor C, uma amostra de solos de vinha (C\_V).

Os solos foram classificados de acordo com a nomenclatura da FAO, tendo sido obtidas as seguintes classificações (Fonte: Projeto Fitofarmgest)

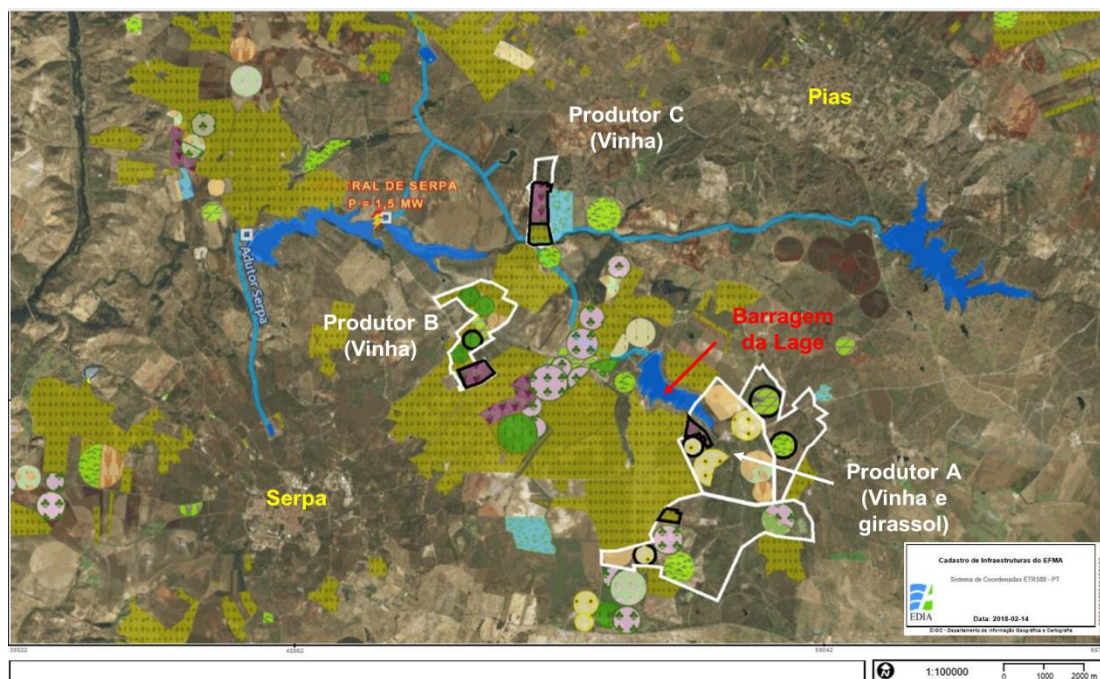
Vinha do produtor A: Cambissolos (Vc')

Vinha do produtor B: Cambissolos (Pc') e Vertissolos (Bvc)

Vinha do produtor C: Cambissolos (Vc')

Girassol do produtor A: Vertissolos pélicos (Vp) e Cambissolos crómicos (Bc).

As campanhas de amostragem decorreram em dois períodos diferentes: primeira amostragem, no final do ciclo cultural, no Outono de 2018, tendo as amostras sido analisadas relativamente aos parâmetros físico-químicos e atividade enzimática da desidrogenase, e a segunda amostragem, no início do ciclo cultural, na Primavera de 2019, tendo estas amostras sido utilizadas para a análise dos restantes parâmetros biológicos (plaqueamento e a avaliação molecular).



**Figura 3.1** - Localização das parcelas agrícolas avaliadas: A, B e C, todas situadas no empreendimento hidroagrícola Brinches-Enxoé, subsistema Ardila (Albufeira do Alqueva) (Fonte: Projeto Fitofarmgest).

A conversão da atividade de sequeiro para a exploração de culturas de regadio, assente no uso eficiente e sustentável dos recursos hídricos, traduz-se numa maior produtividade e rentabilidade, mas exige uma intensificação das práticas culturais utilizadas, não só a rega, mas, também, a utilização de fertilizantes e de produtos fitofarmacêuticos. Nas Tabelas 3.1 a 3.8 apresentam-se os itinerários culturais, produtos fitofarmacêuticos e adubos, a que foram submetidas as vinhas e o girassol dos diferentes produtores.

**Tabela 3.1-** Caracterização do itinerário dos produtos fitofarmacêuticos utilizados na parcela de girassol do produtor A (Fonte: Projeto Fitofarmgest). Nota: os produtos foram aplicados uma única vez, **exceto indicação em contrário, a negrito**).

Produtos fitofarmacêuticos usados na parcela do produtor A							
Cultura	Área (ha)	Nome comercial	Substância ativa	Dose (L/ha ou kg/ha)	Concentração g/L	Unidades	Função
Girassol	14	Starpendi	pendimetalina	4	331 g/L	L/ha	Herbicida
		Decis expert	deltametrina	0,125	100 g/L	L/ha	Inseticida

**Tabela 3.2-** Caracterização do itinerário dos produtos fitofarmacêuticos utilizados na parcela de vinha do produtor B (Fonte: Projeto Fitofarmgest). Nota: os produtos foram aplicados uma única vez, **exceto indicação em contrário, a negrito**).

Produtos fitofarmacêuticos usados na parcela do produtor B							
Cultura	Área (ha)	Nome comercial	Substância ativa	Dose (L/ha ou kg/ha)	Concentração g/L	Unidades	Função
Vinha (Aragonez)	9	Zagaia	flazassulfurão	190	250 g/L	gr/ha	Herbicida
		Glyphogan	glifosato	4	360 g/L	L/ha	Herbicida
		Tebutop	tebuconazol	(0,4;0,4)	25%	L/ha <b>(2 aplicações)</b>	Fungicida
		Forum F	dimetomorfe+folpete	1,5	11,3%+60%	kg/ha	Fungicida
		Ekyp MZ	mancozebe+metalaxil	2,5	64%+8%	kg/ha	Fungicida
		Profilier	fluopicolida+fosetil	2,5	44,4g/kg+621,5 g/kg	kg/ha	Fungicida
		Prosper	espiroxamina	0,6	500 g/L	L/ha	Fungicida
		Melody cobre	cobre (oxicloreto) +iprovalicarbe	1,5	40,6%+8,4%	kg/ha	Fungicida
		Collis	cresoxime-metilo	0,4	300 g/L	L/ha	Fungicida
		Rhodax flash	folpete+fosetil	1,5	250g/kg+466 g/kg	kg/ha	Fungicida
		Confidor o-TEC	imidaclopride	0,35	200 g/L	L/ha	Inseticida
		Melody	folpete+iprovalicarbe	1,3	56,3%+9%	kg/ha	Fungicida
		Luna experience	fluopirame+tebuconazol	0,4	200 g/L +200 g/L	L/ha	Fungicida



**Tabela 3.3-** Caracterização do itinerário dos produtos fitofarmacêuticos utilizados na parcela de vinha do produtor A (Fonte: Projeto Fitofarmgest). Nota: os produtos foram aplicados uma única vez, **exceto indicação em contrário, a negrito**).

Produtos fitofarmacêuticos usados na parcela do produtor A							
Cultura	Área (ha)	Nome comercial	Substância ativa	Dose (L/ha ou kg/ha)	Concentração g/L	Unidades	Função
Vinha (Antão Vaz)	4,5	Quadris	azoxistrobina	0,8	250 g/L	L/ha	Fungicida
		Ridomil	metalaxil-M	2	465 g/L	kg/ha	Fungicida
		Flint	trifloxistrobina	150	50%	gr/ha	Fungicida
		Ksar vitis	cresoxime-metilo	0,4	25%+8,75%	kg/ha	Fungicida
			+penconazol				
		Dynali	ciflufenamida	600	30%+60%	mL/ha	Fungicida
			+difenconazol				
		Profilier	fluopicolida+fosetil	2,5	44,4g/kg+621,5 g/kg	kg/ha	Fungicida
		Prosper	espiroxamina	(600;600)	500 g/L	L/ha ( <b>2 aplicações</b> )	Fungicida
		Melody cobre	cobre (oxicloreto) +iprovalicarbe	1,5	40,6%+8,4%	kg/ha	Fungicida
		Vitipeç C	cimoxanil+ oxicloreto de cobre	3	4%+40%	kg/ha	Fungicida
		Rhodax flash	folpete+fosetil	1,5	250g/kg+466 g/kg	kg/ha	Fungicida
		Melody	folpete+iprovalicarbe	1,3	56,3%+9%	kg/ha	Fungicida

**Tabela 3.4-** Caracterização do itinerário dos produtos fitofarmacêuticos utilizados na parcela de vinha do produtor A (Fonte: Projeto Fitofarmgest). Nota: os produtos foram aplicados uma única vez, **exceto indicação em contrário, a negrito**).

Produtos fitofarmacêuticos usados na parcela do produtor A							
Cultura	Área (ha)	Nome comercial	Substância ativa	Dose (L/ha ou kg/ha)	Concentração g/L	Unidades	Função
Vinha (Antão Vaz)	4,5	Quadris	azoxistrobina	0,8	250 g/L	L/ha	Fungicida
		Ridomil	metalaxil-M	2	465 g/L	kg/ha	Fungicida
		Flint	trifloxistrobina	150	50%	gr/ha	Fungicida
		Ksar vitis	cresoxime-metilo	0,4	25%+8,75%	kg/ha	Fungicida
			+penconazol				
		Dynali	ciflufenamida	600	30%+60%	mL/ha	Fungicida
			+difenconazol				
		Profilier	fluopicolida+fosetil	2,5	44,4g/kg+621,5 g/kg	kg/ha	Fungicida
		Prosper	espiroxamina	(600;600)	500 g/L	L/ha ( <b>2 aplicações</b> )	Fungicida
		Melody cobre	cobre (oxicloreto) +iprovalicarbe	1,5	40,6%+8,4%	kg/ha	Fungicida
		Vitipeç C	cimoxanil+ oxicloreto de cobre	3	4%+40%	kg/ha	Fungicida
		Rhodax flash	folpete+fosetil	1,5	250g/kg+466 g/kg	kg/ha	Fungicida
		Melody	folpete+iprovalicarbe	1,3	56,3%+9%	kg/ha	Fungicida

**Tabela 3.5-** Caracterização do itinerário dos produtos fitofarmacêuticos utilizados na parcela de vinha do produtor C (Fonte: Projeto Fitofarmgest). *Nota: os produtos foram aplicados uma única vez, exceto indicação em contrário, a negrito).*

Produtos fitofarmacêuticos usados na parcela do produtor C							
Cultura	Área (ha)	Nome comercial	Substância ativa	Dose (L/ha ou kg/ha)	Concentração g/L	Unidades	Função
Vinha (Antão Vaz)	1,5	FUEGO SAPEC	oxifluorfena	0,6	240 g/L	L/ha	Herbicida
		Roundup flex	glifosato	3	360 g/L	L/ha	Herbicida
		Focus Ultra	cicloxidime	1	100 g/L	L/ha	Herbicida
		Douro	penconazol	0,33	100 g/L	L/ha	Fungicida
		Envidor	espirodiclofena	0,32	240 g/L	L/ha	Inseticida
		Ekyp MZ	mancozebe+metalaxil	2,5	64%+8%	kg/ha	Fungicida
		Profiler	fluopicolida+fosetil	2	44,4g/kg+621,5 g/kg	kg/ha	Fungicida
		Prosper	espiroxamina	0,3	500 g/L	L/ha	Fungicida
		Melody cobre	cobre (oxicloreto) +iprovalicarbe	0,75	40,6%+8,4%	kg/ha	Fungicida
		Collis	cresoxime-metilo	0,25	300 g/L	L/ha	Fungicida
		Rhodax flash	folpete+fosetil	3	250g/kg+466 g/kg	kg/ha	Fungicida
		Confidor classic	imidaclopride	0,35	200 g/L	L/ha	Inseticida
		Vitipeç C WG advance	cimoxanil+cobre (oxicloreto)	3	4%+40%	kg/ha	Fungicida
		Vivando	metrafenona	0,25	500 g/L	L/ha	Fungicida
		Embaixador 224 EC	clorpirifos-metilo	1,2	224 g/L	L/ha	Inseticida

**Tabela 3.6-** Caracterização do itinerário da fertilização utilizada na parcela de girassol do produtor A  
(Fonte: Projeto Fitofarmgest).

Fertilização usada na parcela do produtor A					
Cultura	Área (ha)	Justificação	Produto e sua composição	Dose (L/ha ou kg/ha)	Unidade
Girassol	14	Adubação	20-17-0	200	Kg/ha
		Adubação	Marlon verde	3	L/ha
		Adubação	Tradebor	2	L/ha
		Adubação	Adubo 27% (5%SO <sub>3</sub> ) (2 aplicações)	(170;120)	L/ha

**Tabela 3.7-** Caracterização do itinerário da fertilização utilizada na parcela de vinha do produtor A  
(Fonte: Projeto Fitofarmgest).

Fertilização usada na parcela do produtor A					
Cultura	Área (ha)	Justificação	Produto e sua composição	Dose (L/ha ou kg/ha)	Unidade
Vinha (Antão Vaz)	4,5	Adubação	Terravit 3-5-2	364	kg/ha
		orgânica			
		Adubação (N,P,K)	8-12-12	200	kg/ha
		Adubação (N,P,K)	6-3-12	400	kg/ha

**Tabela 3.8-** Caracterização do itinerário da fertilização utilizada na parcela de vinha do produtor B (Fonte: Projeto Fitofarmgest).

Fertilização usada na parcela do produtor B					
Cultura	Área	Justificação	Produto e sua composição	Dose (L/ha ou kg/ha)	Unidades
Vinha (Aragonez)	9	Adubação	Ecofem (adubo orgânico) 3%N, 6%P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , 5%K <sub>2</sub> O, 7%CaO, 1%Fe, 63%MO, 35%C org., 6,5%ác. Húmicos e 6,5%ác. fúlvicos	750	kg/ha
		Adubação	Matéria orgânica (7 aplicações)	Não especificado	kg/ha
		Adubação	Ureia (adubo azotado 46%N)	2,7	kg/ha
		Adubação	Ácido nítrico (adubo azotado 60%N) (4 aplicações)	(0,1; 0,2; 0,2;1)	L/ha
		Adubação	Tensotec (adubo potássico 10% K <sub>2</sub> O) (8 aplicações)	(0,13;0,26;0,5;0,81;0,81;1;1;1)	L/ha
		Adubação (N,P,K)	CV46 (6-10-20)	300	kg/ha
		Adubação (N,P,K)	Entecnitrofoska14 (14-7-17)	300	kg/ha
		Adubação	Actyfer (adubo férrico 0,26%) (3 aplicações)	(1;1;0,5)	kg/ha
		Adubação	Starfol (adubo orgânico)	0,5	L/ha
		Adubação (N,P,K)	Olifol C (12-10-20)	4	L/ha
		Adubação (N,P,K)	Completo C (20-3,7-16)	4	L/ha
		Adubação	Stimulus (bioestimulante 3,6%N)	1,6	L/ha
		Adubação	Ácido fosfórico (adubo fosfórico 51,5% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) (4 aplicações)	(0,81;0,81;1;1)	L/ha
		Adubação (N,P,K)	Nutricomplex (2 aplicações)	(6,5;6,5)	Kg/ha

**Tabela 3.9-** (Continuação) Caracterização do itinerário da fertilização utilizada na parcela de vinha do produtor B (Fonte: Projeto Fitofarmgest).

Fertilização usada na parcela do produtor B					
Cultura	Área	Justificação	Produto e sua composição	Dose (L/ha ou kg/ha)	Unidades
Vinha (Aragonez)	9	Adubação	Tecnifol Boro (11%B)	0,5	L/ha
		Adubação	Tecnifol MZ (5%Mn, 7,5%Zn, 7,5%N, 16%SO <sub>2</sub> )	1	L/ha
		Adubação	Fitoalgas green (bioestimulante)	0,5	L/ha
		Adubação (N,P,K)	7-12-40	12,5	kg/ha
		Adubação	Nitrato de potássio (13,2%N, 46%K <sub>2</sub> O) (5 aplicações)	(12,5; 12,5; 12,5; 12,5; 12,5)	kg/ha
		Adubação (N,P,K)	23-6-6	7,5	kg/ha
		Adubação (N,P,K)	13-40-13	7,5	kg/ha

**Tabela 3.10-** Caracterização do itinerário da fertilização utilizada na parcela de vinha do produtor C  
(Fonte: Projeto Fitofarmgest).

Fertilização usada na parcela do produtor C					
Cultura	Área (ha)	Justificação	Produto e sua composição	Dose (L/ha ou kg/ha)	Unidade
Vinha (Antão Vaz)	1,5	Adubação (N,P,K)	Agrimartin Bio 5-0-3	5	kg/ha
		Adubação férica	Agrimartin Bio Fe	5	kg/ha
		Adubação (N,P,K)	YaraMila actyva 20- 7-10	300	kg/ha
		Adubação (N,P,K)	Nitrato de potássio 13,5-0-46,5	45	kg/ha
		Adubação	Basafer plus (6% Fe) (2 aplicações)	(1,5;2)	kg/ha

A Tabela 3.9 resume as práticas culturais apresentadas na Tabela 3.1 a 3.8, a que foram sujeitas as diferentes parcelas, classificando-as relativamente à sua intensidade, bem como a dotação de rega utilizada.

**Tabela 3.11-** Tabela resumo das práticas culturais submetidas nas diferentes parcelas

Algumas práticas culturais						
Parcelas	Ad. mineral	Ap. MO	Ap. pesticida	Mob. solo	R. cultura	Dotação de rega (mm)
A_V	+	+	-			396
B_V	++	++	++			260
C_V	++		++			300
A_G	+		-	+	+	2520

Quantidade elevada (++); Quantidade moderada (+) e Quantidade reduzida (-)

Para além das práticas culturais já mencionadas nas Tabelas 3.1 a 3.8, são de considerar também a mobilização do solo feita apenas na parcela com cultura anual, a aplicação de herbicidas em todas as vinhas, e o facto de nenhuma das parcelas de vinha ter enrelvamento natural ou artificial, nem ter havido a manutenção das lenhas de poda no solo.

### **3.2. Caracterização dos solos na área de estudo**

Para a caracterização físico-química dos solos, cujos resultados são utilizados neste trabalho, foi efetuada uma campanha de amostragem no final do ciclo cultural do ano de 2018, ajustada ao ciclo vegetativo da cultura (que corresponde à 2ª campanha de amostragem do projeto, setembro/outubro de 2018), na camada 0-20 cm. Foi recolhida uma amostra composta por cada 5 ha de área da parcela, a partir da mistura de subamostras colhidas em vários pontos, marcados aleatoriamente em ziguezague. Os solos foram secos ao ar e crivados, tendo-se analisado a fração fina (< 2 mm), relativamente aos seguintes parâmetros:

- Análise granulométrica e classificação da classe de textura;
- pH (H<sub>2</sub>O), na proporção 1:2,5 m/v em água destilada;
- Condutividade elétrica (CE), na proporção, 1:2 m/v (mS/cm);
- Matéria orgânica (método de Walkley-Black) (% m/m, concentração expressa em percentagem mássica na matéria seca, ms) (Walkley e Black, 1934);
- Azoto Kjeldahl (N<sub>Kj</sub>) (% m/m ms) (Bremner, 1960);
- P e K extraíveis, método de Ehner-Rhiem (g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/kg e g K<sub>2</sub>O/kg, respetivamente) (Riehm, 1958).

Todos os resultados obtidos foram corrigidos à matéria seca (ms), após a sua determinação até peso constante a 105°C.

As análises foram efetuadas nos Laboratórios da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja, no âmbito do Projeto Fitofarmgest, sendo os seus valores comentados nos Resultados (Sub-capítulo 4.1).

### **3.3. Metodologias de avaliação da atividade biológica**

#### **3.3.1. Atividade enzimática da desidrogenase**

O procedimento analítico de determinação da atividade enzimática da desidrogenase baseia-se na redução do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a trifenílformazan (TPF),



uma vez que, na ausência de oxigênio, o TTC atua como aceitador final de elétrons. A solução de TTC é adicionada à amostra de solo sendo a mistura incubada a 25°C durante 16 h. O TPF libertado é extraído com acetona e determinado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 485 nm (Chander & Brookes, 1991; Tabatabai, 1982; ISO 23753-1, 2002).

Todos os resultados obtidos foram corrigidos à matéria seca (ms), após a sua determinação até peso constante a 105°C, sendo apresentados em µg TPF/g ms/16 h.

### 3.3.2. Contagem de colônias de microrganismos presentes nos solos

Os trabalhos conducentes à contagem de colônias de microrganismos presentes nos solos das diferentes parcelas submetidas a diferentes práticas culturais, foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular e Micropropagação de Horticultura do Instituto Superior de Agronomia. Foram analisadas as sete amostras de solo referidas anteriormente, sendo quatro destas provenientes de parcelas com cultura permanente, vinha, de três produtores diferentes, sujeitas a diferentes práticas culturais, e três amostras provenientes de uma parcela com cultura anual de girassol.

### 3.3.3. Preparação do meio de cultura para plaqueamento de extratos de solos

O plaqueamento é um processo que tem início na preparação de meios de cultura para o crescimento dos microrganismos (bactérias e fungos). Para tal, foram preparados dois diferentes meios de cultura, nomeadamente o meio de Luria-Bertani (LB) para o crescimento de bactérias e o meio de batata dextrosada (PDA) para fungos. Para preparação do LB usou-se 25 g de LB BROTH (*high salt*) e 14 g de Agar bacteriological (Scharlau), em 1 L de água esterilizada, enquanto que para o PDA utilizou-se 39 g de Difco™ Potato Dextrose Agar em 1 L de água esterilizada. Uma observação importante é que na preparação do LB, depois de dissolvidos os reagentes em 0,5 L de água esterilizada, foi necessário equilibrar o pH até 7,2 através de um potenciómetro e, posteriormente, adicionou-se os restantes 0,5 L de água, o que não ocorreu com o PDA. Depois de dissolvidos, ambos os meios foram levados ao autoclave para serem esterilizados a 120°C, 1 bar durante 15 minutos. Enquanto o processo de esterilização dos meios decorria, foram-se preparando os recipientes (placas de Petri), onde deviam ser distribuídos os meios de cultura, após estes saírem do autoclave. Esta preparação

ocorreu dentro de uma câmara de fluxo laminar devidamente desinfetada para evitar a contaminação das placas. Após a autoclavagem, os meios de cultura foram retirados do autoclave e postos a arrefecer a temperatura ambiente para não queimar as placas de Petri e, enquanto isso ocorria, acrescentou-se 200 µl de (antibiótico) canamicina somente ao PDA, com intuito de impedir o crescimento das bactérias sobre os fungos, sendo que estes têm um crescimento mais lento do que as bactérias. Uma vez terminado o arrefecimento dos meios de cultura (estarem mornos), estes foram distribuídos nas placas e, por último, esperou-se até solidificarem por arrefecimento. Fecharam-se as placas e mantiveram-se à temperatura ambiente até à sua utilização.

#### 3.3.4. Inoculação e incubação de bactérias e fungos

Preparou-se o extrato de solo para uso na inoculação a partir de uma amostra de solo seco à temperatura ambiente, moída com ajuda de um almofariz e pilão, sendo depois crivada. Tomou-se uma subamostra de 100 mg de solo, que foi colocada num tubo de 2 ml, à qual se adicionou 250 µl de água esterilizada. A mistura foi homogeneizada num vortex, durante 10 min e finalmente centrifugou-se a 13 000g durante 1 min, de modo a obter o solo após esta operação de lavagem.

Reunidas as condições essenciais (meios de cultura já sólidos em placas de Petri e o extrato de solo preparado), deu-se início ao processo do plaqueamento propriamente dito. Este processo foi feito dentro duma câmara de fluxo laminar, desinfetada, e para tal foram necessários, além dos meios de cultura e dos extratos de solo, os seguintes materiais: lamparina, ança, etanol e material de pipetagem.

Cada extrato de solo referente a cada amostra de solo foi inoculado nos dois meios, sendo inoculadas duas placas por cada meio, uma com 10 µl e outra com 100 µl, respetivamente, com o objetivo de observar o gradiente da carga microbiológica. O processo decorreu da seguinte forma: foram pipetados 10 µl de extrato de solo e colocou-se cuidadosamente no centro de uma placa de Petri que continha o meio de cultura LB. De igual modo, foi preparada uma placa de Petri com PDA.

O passo anterior foi repetido utilizando 100 µl de extrato de solo no plaqueamento em LB e PDA.

Depois de distribuir os extratos de solo no centro das placas de Petri que continham os meios de cultura, com auxílio de uma ança devidamente esterilizada com etanol e

passagem na chama, espalhou-se o extrato ao longo de toda a placa com cuidado, para não danificar o meio de cultura. A ordem para espalhar o extrato no meio de cultura foi do menor volume, 10 µl, para o maior, 100 µl, e começou-se sempre pelas placas de Petri que tinham o meio LB. Uma vez feito este passo com as duas placas de LB, com 10 e 100 µl de extrato de solo respectivamente, voltou-se a esterilizar a ança e, de forma similar, fez-se também com as duas placas de Petri com PDA. Este processo foi repetido o número de vezes necessárias à análise de todas as amostras de extrato dos solos em estudo.

Terminado este processo, selaram-se as placas de Petri com *parafilme* para evitar contaminações. As placas com cada um dos meios de cultura, LB e PDA, foram incubadas em condições diferentes, uma vez que se destinavam à obtenção de microrganismos diferentes: as placas de Petri com LB, onde se vão desenvolver colónias de bactérias, foram colocadas numa incubadora a 37°C, e as placas de Petri com PDA, onde se vão desenvolver colónias de fungos, foram deixadas à temperatura ambiente. Após 24 h, as placas de Petri com LB, foram retiradas da incubadora de modo a efetuar a contagem do número de colónias de bactérias que se desenvolveram durante este período, tendo sido feito o mesmo para as colónias de fungos nas placas de Petri com PDA.

### 3.3.5. Avaliação molecular da abundância relativa de genes específicos de fungos e bactérias

A avaliação molecular da abundância relativa de genes específicos de fungos e bactérias dos solos analisados foi também realizada nos Laboratórios de Biologia Molecular e Micropropagação de Horticultura do Instituto Superior de Agronomia. Esta avaliação compreendeu a extração de DNA total a partir do solo, a sua quantificação e utilização em reações de PCR com *primers* específicos de fungos e bactérias.

#### 3.3.5.1. Protocolo de isolamento do DNA do solo

O isolamento de DNA foi realizado conforme recomendado no manual de utilização do DNA *PowerSoil kit* (Qiagen), utilizando os reagentes fornecidos nesse *kit*, adiante designadas por soluções C1, C2, C3, C4, C5 e C6, e tubos de 2 ml de capacidade - tubos *PowerBead*.

Para a extração do DNA dos microrganismos do solo, as amostras foram secas ao ar, tendo-se removido o máximo possível de detritos e raízes de plantas. Após secagem, o solo foi moído num almofariz para desagregar, e crivado. As amostras obtidas foram arrefecidas com azoto líquido, sendo que a sua congelação permite a sua moagem mais efetiva, a qual foi efetuada novamente em almofariz. Uma toma de 250 mg desta amostra de solo finamente moída foi adicionada aos tubos *PowerBead*, e homogeneizada num agitador de vortex. Seguidamente, adicionaram-se 60 µl de solução C1, agitou-se novamente em vortex durante 10 min, e centrifugou-se a 10 000g durante 30 s.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo de recolha, ao qual se adicionou 250 µl de solução C2. Agitou-se por 5 min e colocou-se a incubar por 5 min a uma temperatura entre 2 a 8°C (frigorífico).

Após a incubação, centrifugaram-se as amostras durante 1 min a 10 000g, transferiram-se 600 µl do sobrenadante para um novo tubo de recolha, sendo adicionados 200 µl de solução C3. Agitou-se em vortex, incubou-se novamente a uma temperatura entre 2 a 8°C (frigorífico) por 5 min, e centrifugou-se durante 1 min a 10 000g.

Após esta centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de recolha ao qual se adicionaram-se 1200 µl de solução C4. Agitou-se em vortex durante 5 s para homogeneização, sendo seguidamente carregados 675 µl desta suspensão numa coluna de separação MB *Spincolumn*, existente no *kit*, onde vai ficar retido o DNA. Esta coluna é centrifugada durante 1 min a 10 000g para eliminação da fase líquida remanescente. Repetiu-se este passo duas vezes, até que toda a amostra foi processada.

Posteriormente, a coluna com o DNA foi sujeita a uma lavagem, sendo adicionados 500 µl de solução C5 à coluna que se colocou num outro tubo de recolha. Centrifugou-se por 30 s a 10 000g, eliminou-se novamente a fase líquida e, em seguida, centrifugou-se novamente por 1 min a 10 000g para eliminação completa de tudo o que esteja retido na coluna após lavagem do DNA.

Finalmente, colocou-se cuidadosamente a coluna MB com o DNA num tubo de recolha de 2 ml, sendo adicionados 100 µl de solução C6 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5), ao centro da membrana, no filtro branco. Centrifugou-se por 30s a 10 000g, recolhendo-se a solução C6 do tubo, para a qual foi transferido o DNA, que foi posteriormente armazenado no congelador.

### 3.3.5.2. Quantificação do DNA extraído

#### 3.3.5.2.1. Quantificação direta

A quantificação do DNA em cada extrato foi determinada espectrofotometricamente, com recurso à medição da absorvância a 260 nm, sabendo que 1 unidade de  $A_{260}$  nm = 50 µg/ml. Para avaliar a qualidade do DNA extraído, mediu-se também a absorvância a 230 nm (contaminação com polissacáridos, entre outras macromoléculas) e a 280 nm (contaminação com proteínas e fenóis), tendo-se calculado as razões  $A_{260}/A_{230}$  e  $A_{260}/A_{280}$ . A avaliação espectrofotométrica foi realizada num Gene Quant pro, com uma cuvete de quartzo, numa diluição de 1:10 (5 µl de extrato e 45 µl de água destilada esterilizada).

#### 3.3.5.2.2. Quantificação indireta

Para ter uma melhor ideia da degradação do DNA extraído, procedeu-se à quantificação deste por eletroforese em gel de agarose. Para tal, preparou-se um gel com 1,2% de agarose em 1xTAE (tris-acetato EDTA, Sambrook et al., 1989), que se corou com *Greensafe* (NZYtech), um corante que se intercala na molécula de DNA, o que permite a sua visualização com transiluminador de ultravioleta em câmara escura. Uma toma de extrato com, aproximadamente, 10 µl de DNA foram combinados com 2 µl de bromofenol e foram carregados no gel previamente preparado e solidificado. Em simultâneo, carregou-se também 1 µl de marcador λHindIII EcoRI, combinado com 9 µl de água destilada esterilizada e 2 µl de bromofenol. O gel correu em 1 xTAE durante 60 min a 100 V, sendo de seguida visualizado com iluminação ultravioleta.

#### 3.3.5.3. PCR para bactérias

A PCR foi conduzida utilizando um termociclador UNO-Thermoblock (Biometra), e os iniciadores bacterianos específicos utilizados (*primers*) foram B27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3') e V1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Sagar et al., 2014). Todas as amplificações foram realizadas num volume global de 25 µl, sendo 20 µl de *mix* de reação e 5 µl de DNA molde de cada amostra. Cada volume de amostra de 25 µl continha 14,65 µl de água, 2,5 µl de 10xPCR buffer, 1,25 µl de  $MgCl_2$ , 0,5 µl de dNTPs, 0,5 µl de *primer* B27F, 0,5 µl de *primer* V1492R, 0,1 µl de Taq

polimerase (Supreme NZYTaQ II DNA poly) e 5 µl de DNA molde. Feita a mistura dos reagentes, centrifugou-se a 13 000g por 1 min, tendo-se adicionado 5 µl de extrato de solo ao tubo. Centrifugou-se a mistura a 13 000g por 1 min, após o que se acrescentou duas gotas de óleo mineral ao tubo, para evitar a evaporação das amostras. Finalmente, os tubos foram colocados no termociclador do PCR.

A PCR das bactérias foi realizada usando o seguinte programa térmico: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificações a 94°C por 45 s, emparelhamento dos *primers* a 52°C por 45 s, extensão das cadeias a 72°C por 45 s seguidos de um período de extensão final a 72°C por 5 min.

Terminados os 35 ciclos programados no termociclador, as amostras foram retiradas e mediram-se 10 µl de cada amostra, que se combinaram com 2 µl de bromofenol, além disso mediu-se também 9 µl de água destilada esterilizada e misturou-se com 2 µl de bromofenol e 1 µl de marcador 100 bp Ladder Plus (Fermentas) para se diferenciar das bandas das amostras. Logo a seguir, as amostras e o marcador foram colocados a correr em gel de 2% de agarose, 1xTAE, em condições semelhantes às apresentadas para a quantificação indireta de DNA, com o objetivo de observar a intensidade das bandas de DNA amplificado a partir das bactérias.

De referir que, as amostras foram colocadas a correr no gel de agarose pela seguinte ordem: A\_V, A\_G-1, A\_G-2, A\_G-3, B\_V-1, B\_V-2, e C\_V), ou seja, por produtor, sendo o marcador o último da fila.

#### 3.3.5.4. PCR para fungos

A mistura de amplificação por PCR continha 5 µl de DNA molde, 14,65 µl de água, 2,5 µl de 10xPCR buffer, 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de dNTPs, 0,5 µl ITS1F, 0,5 µl ITS4R, 0,1 µl de Taq DNA polimerase (Supreme NZYTaQ II DNA poly) numa reação final de 25 µl. O DNA foi amplificado seguindo o seguinte programa térmico: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificações a 94°C por 45 s, 56°C por 45 s, 72°C por 45 s, seguidos de um período de extensão a 72°C por 5 min. Os *primers* utilizados neste estudo para a amplificação de sequências específicas de fungos foram ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Sharma et al., 2013). Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose, em condições semelhantes às referidas anteriormente.

### 3.4. Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados obtidos para a análise físico-química dos solos e para a atividade enzimática da desidrogenase foram sujeitos a uma análise de variância a uma via (ANOVA), de modo a verificar se havia diferenças estatísticas entre os resultados ( $p < 0,05$ ). Sempre que foram encontradas diferenças significativas, as médias foram discriminadas utilizando o teste *post-hoc* Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

Foram calculados os coeficientes de Pearson entre as propriedades físico-químicas analisadas e a atividade enzimática da desidrogenase ( $p < 0,05$ ;  $n = 21$ ).

A análise estatística foi efetuada utilizando o programa STATISTICA 7.0 (Software™ Inc., PA, USA, 2004).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização físico química dos solos nas diferentes parcelas

Os resultados apresentados neste subcapítulo foram obtidos ao abrigo do Projeto Fitofarmgest, e as análises foram realizadas nos Laboratórios da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja. A sua apresentação e discussão permitirá uma melhor compreensão dos resultados obtidos nas análises bioquímicas e microbiológicas.

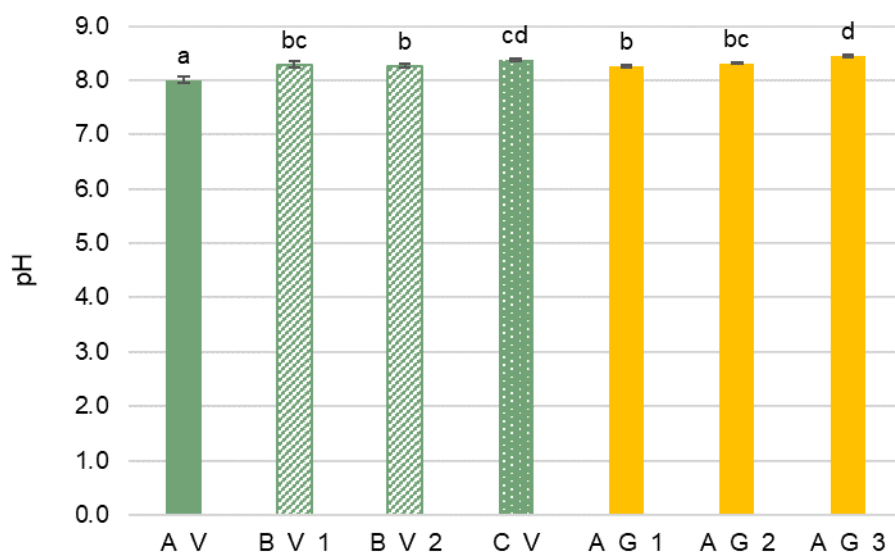
A classe textural dos solos analisados (Tabela 4.1) variou entre franco, franco-argiloso e argilo-limoso.

**Tabela 4.1-** Classificação da classe textural dos solos utilizados no estudo (Fonte: projeto Fitofarmgest).

Amostra	Análise granulométrica (g kg <sup>-1</sup> )				Classe textural
	areia	areia	limo	argila	
	grossa	fina			
A_V	230	197	205	368	franco-argiloso
B_V_1	164	166	248	422	argilo-limoso
B_V_2	138	158	294	411	argilo-limoso
C_V	219	257	276	248	franco
A_G_1	203	240	171	386	franco-argiloso
A_G_2	160	207	253	380	franco-argiloso
A_G_3	229	245	152	373	franco-argiloso

Os solos das diferentes parcelas foram analisados, tendo-se verificado que o seu pH (H<sub>2</sub>O) é pouco alcalino (Tabela 2.1; LQARS, 2006) (Figura 4.1), e, embora tenham sido encontradas diferenças significativas entre alguns locais de amostragem, os valores variam num intervalo de valores muito pequeno (8,0 a 8,4).

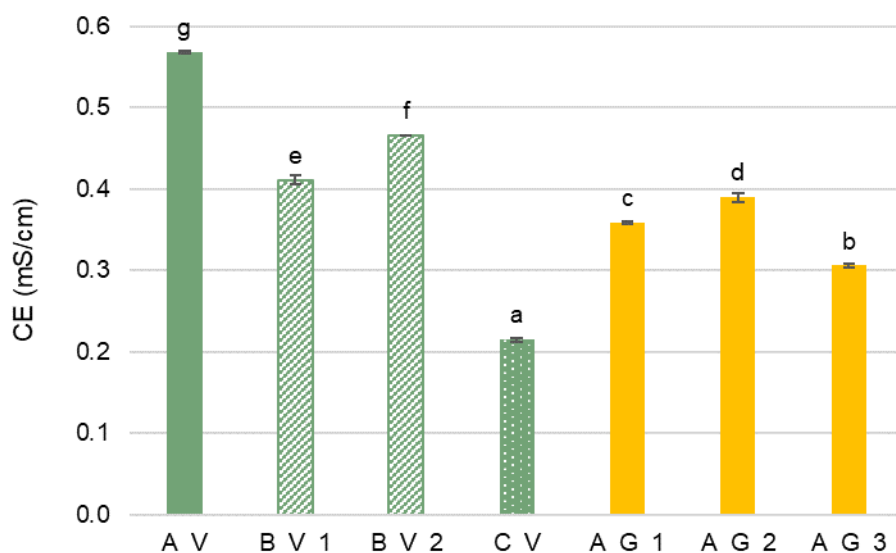




**Figura 4.1-** Valores de pH nos diferentes locais (média  $\pm$  desvio-padrão,  $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD,  $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest).

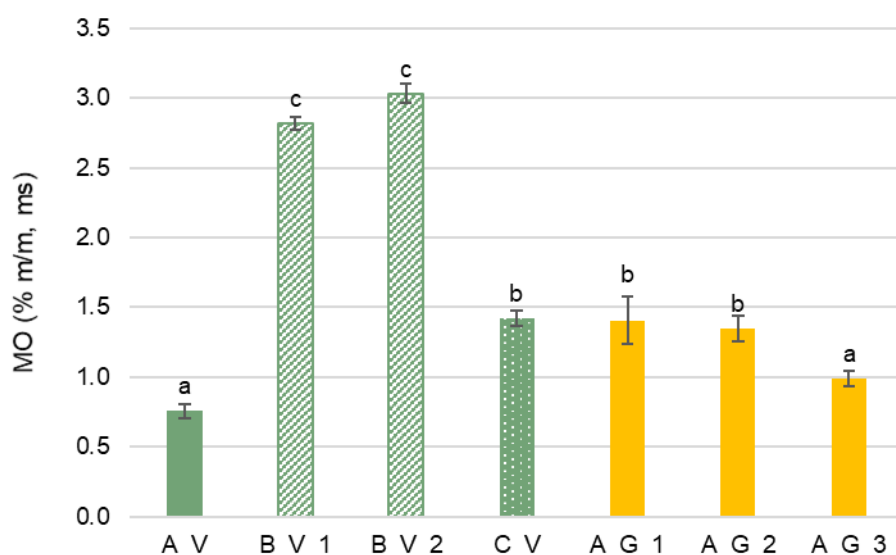
Em relação à condutividade elétrica (CE), um indicador da salinidade dos solos, depois de analisadas as amostras das diferentes parcelas, constatou-se que existem diferenças significativas em todos os locais de amostragem, mesmo para amostras recolhidas na mesma parcela, nos casos em que a parcela é de grande dimensão (e.g., girassol do produtor A), (Figura 4.2). Considerando os resultados obtidos, não é possível avaliar se os seus valores foram mais altos em parcelas com cultura permanente ou com cultura anual, apenas que o valor mais elevado foi obtido no solo da vinha do produtor A (0,56 mS/cm), e o valor mais baixo na vinha do produtor C (0,20 mS/cm). A gama de valores obtidos permite a classificação destes solos como “sem efeitos salinos” a “solos muito pouco salinos”, sendo que apenas culturas muito sensíveis aos sais poderiam ser afetadas (LQARS, 2006).

Nalguns casos, uma maior salinidade de um solo, relativamente a outro, pode ter a ver com diferenças nas quantidades de adubação mineral aplicada, uma vez que esta faz aumentar o teor em sais solúveis no solo e, por consequência, a sua CE, ou uma mineralização acentuada de materiais orgânicos aplicados. Nesse caso, os valores superiores de CE nos solos das vinhas dos produtores A e B poderiam ser devidos a uma aplicação superior de adubos, ou devido à correção orgânica, a qual é efetuada nos dois casos (Tabelas 3.6 e 3.7).



**Figura 4.2-** Valores de condutividade elétrica (CE) nos diferentes locais (média  $\pm$  desvio-padrão,  $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD,  $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest).

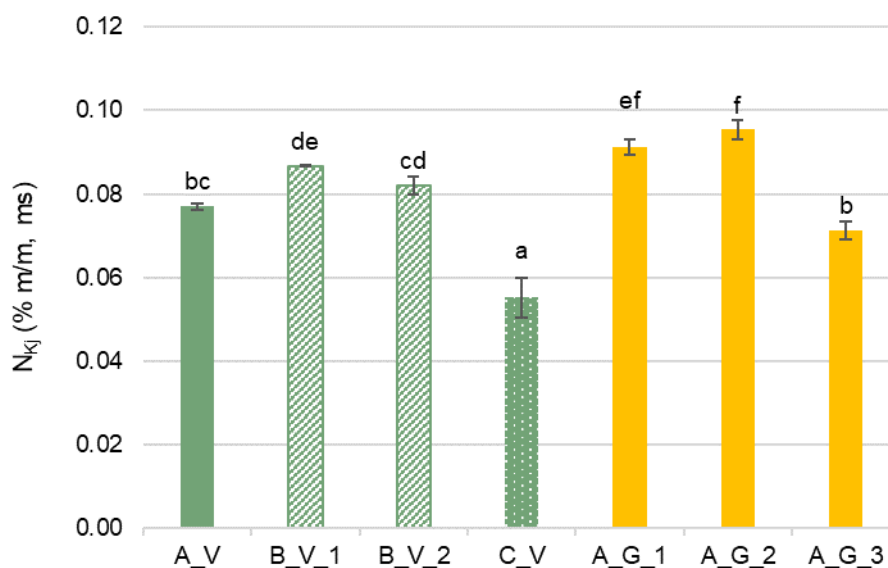
Considerando a classificação textural dos solos como sendo solos de textura média (Tabela 4.1), e os resultados obtidos para os teores de MO destes solos (Figura 4.3), verifica-se que estes solos podem ser classificados como solos com teores que variam entre os valores muito baixos (solos da vinha do produtor A), a teores médios de MO (solos da vinha do produtor B) (Tabela 2.2; LQARS, 2006). Na verdade, este facto não pode ser explicado à luz dos tratamentos aplicados em ambas as vinhas, uma vez que ambas receberam correção orgânica (Tabelas 3.6 e 3.7), sendo o teor de MO no solo da vinha do produtor A o mais baixo de todos. Na verdade, estes valores podem eventualmente ser explicados pelo facto dos solos do produtor A serem, de um modo geral, pobres em matéria orgânica, uma vez que os resultados do teor de MO nos solos com girassol desse produtor serem também baixos, sem diferenças significativas com a MO no solo da sua vinha (A\_V) no caso de uma das amostras (A\_G\_3). Por outro lado, os solos da vinha do produtor B são os que apresentam um teor de MO mais elevado, o que pode ser uma consequência da aplicação do corretivo orgânico referido.



**Figura 4.3-** Teores em matéria orgânica (MO) nos diferentes locais (média  $\pm$  desvio-padrão,  $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD,  $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest).

Normalmente, teores de MO mais elevados são acompanhados por teores de azoto Kjeldahl ( $N_{Kj}$ ) também mais elevados, quando se comparam diferentes solos, uma vez que a maior parte do  $N_{Kj}$  se encontra na forma orgânica, constituindo uma forma de azoto de reserva no solo. Tendo isto em consideração, é compreensível que o solo das diferentes vinhas tenha um teor de  $N_{Kj}$  significativamente diferente, apresentando valores superiores, e sem diferenças significativas entre si, no caso dos solos da vinha do produtor B (justamente aquele onde os solos apresentavam um teor de MO mais elevado (Figura 4.4).

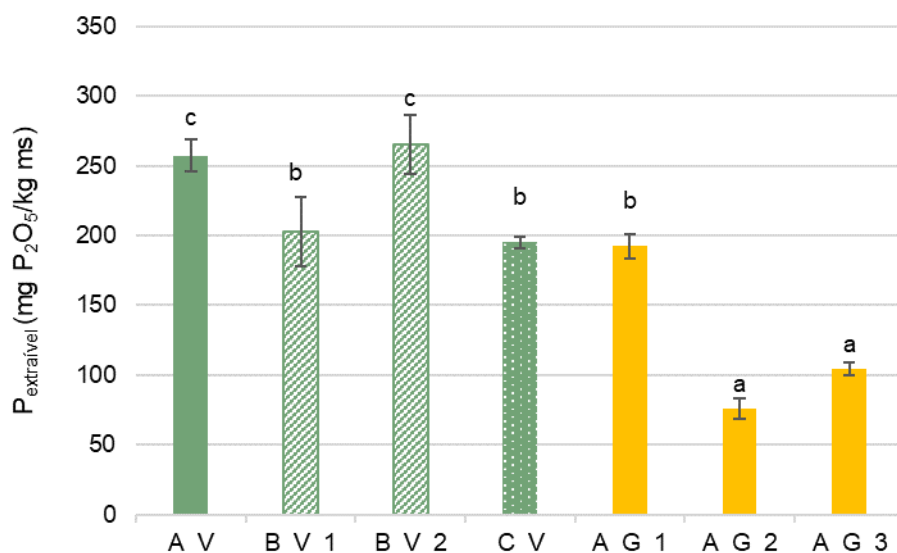
Porém, neste caso, contrariamente ao teor de MO, verificou-se um teor mais elevado de  $N_{Kj}$  nas amostras da parcela com girassol do que nas amostras das parcelas com vinha (apenas significativamente maior do que todos os outros no caso da amostra A\_G\_2), ao contrário da tendência de variação da MO (Figura 4.4). Isto pode explicar-se pela adubação azotada feita na parcela da cultura anual, e pela capacidade alelopática que as folhas de girassol têm de produzir e libertar substâncias que inibem o crescimento de plantas competidoras, havendo pouca competição pelo azoto adicionado através da adubação mineral (Mercali, 2011).



**Figura 4.4-** Teores de azoto Kjeldahl ( $N_{Kj}$ ) nos diferentes locais (média  $\pm$  desvio-padrão,  $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD,  $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest).

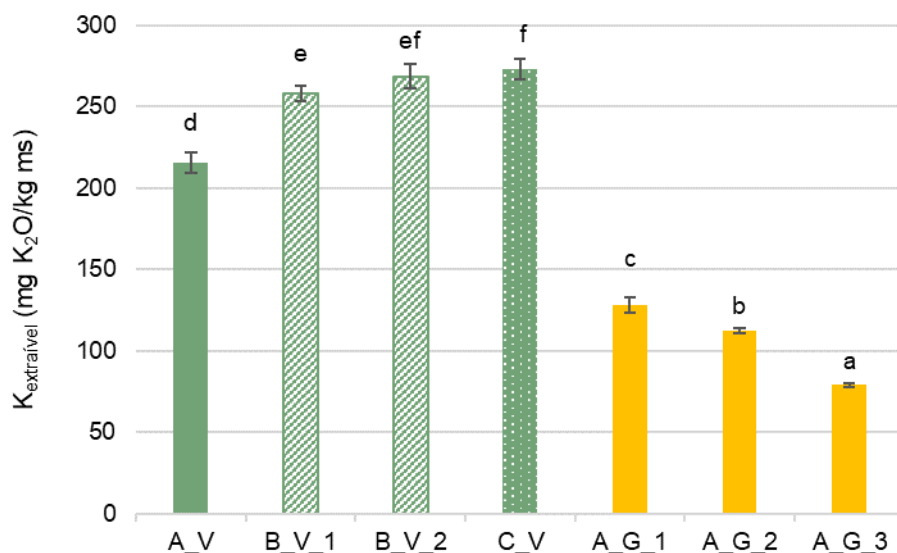
Quanto aos resultados para o teor de  $P_2O_5$  extraível dos solos (Figura 4.5), o intervalo de valores apresentados pelas amostras de solo das diferentes parcelas entre 75 e 270 (mg  $P_2O_5$ /kg ms), permite classificar estes solos como tendo teores médios a muito altos de  $P_2O_5$  extraível (LQARS, 2006; Tabela 2.3). Na verdade, apenas uma das amostras apresenta um teor de  $P_2O_5$  extraível classificado como médio (A\_G\_2), mas sem diferenças significativas da amostra A\_G\_3, que já apresenta um teor classificado como alto.

Embora dois dos solos de vinha (B\_V\_1 e C\_V) não apresentem diferenças significativas relativamente ao solo de um dos locais de amostragem da parcela de girassol (A\_G\_1), há uma tendência para que os solos das vinhas apresentem teores superiores de  $P_2O_5$  extraível, atingindo mesmo valores muito altos ( $> 200$  mg/kg  $P_2O_5$ ), no caso de dois solos das vinhas A\_V e B\_V\_2. Esta mesma tendência é seguida para os resultados obtidos para o  $K_2O$  extraível (Figura 4.6), onde todos os solos de vinha apresentaram teores de  $K_2O$  extraível superiores aos solos da cultura anual, e sempre com diferenças significativas.



**Figura 4.5-** Teores de fósforo extraível (Egner-Rhiem) nos diferentes locais (média  $\pm$  desvio-padrão,  $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD,  $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest).

Na verdade, todas as amostras de solos de vinha apresentam teores muito altos de K<sub>2</sub>O extraível (> 200 mg/kg K<sub>2</sub>O) (LQARS, 2006; Tabela 2.3), com diferenças significativas relativamente os solos com cultura anual de girassol, que se mantiveram em teores alto, ou médios no local de amostragem A\_G\_3.



**Figura 4.6-** Teores de potássio extraível (Egner-Rhiem) nos diferentes locais (média  $\pm$  desvio-padrão,  $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD,  $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest).

Considerando em conjunto os resultados dos parâmetros mais diretamente relacionados com a fertilidade química do solo, os solos com a cultura permanente, vinha, onde o solo não é mobilizado, tendo dois deles recebido correção orgânica, apresentam, de um modo geral, melhores resultados do que na cultura anual, girassol, nomeadamente nos teores em MO, P e K extraíveis. A única exceção é o  $N_{Kj}$ , o que pode ser devido à adubação mais intensiva da parcela de girassol. Será necessário verificar se esta tendência é, ou não, corroborada pelos resultados dos indicadores bioquímicos – fertilidade biológica.

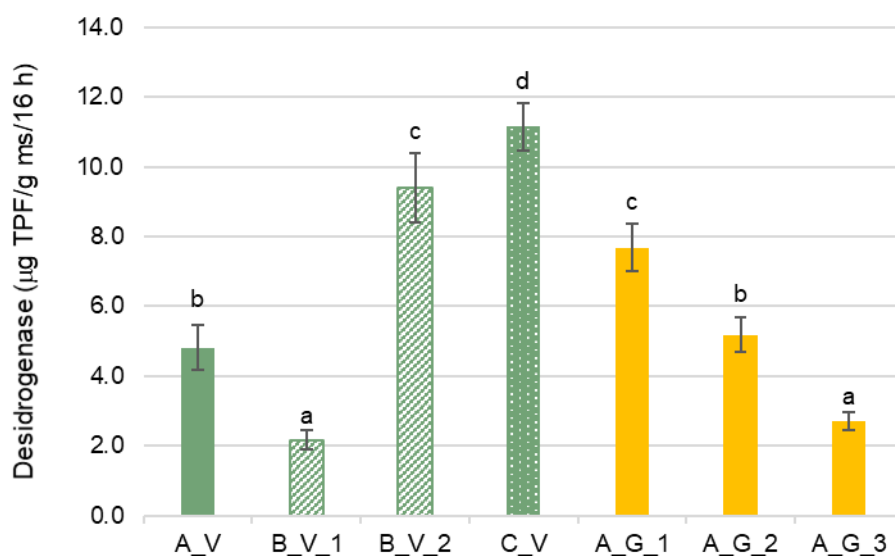
#### **4.2. Atividade enzimática da desidrogenase**

Relativamente à atividade enzimática da desidrogenase, um dos indicadores da biomassa microbiana utilizados neste estudo (Figura 4.7), as duas amostras com maiores valores foram de solos de vinhas, tendo o da vinha C\_V resultados significativamente superiores aos demais.

Porém, os resultados não permitem dizer que há uma diferença marcada na atividade da desidrogenase entre os solos da cultura anual e da cultura permanente, não nos permitindo relacionar estes resultados, de uma forma concreta, com as práticas culturais adotadas. De facto, há inclusive diferenças significativas entre os resultados obtidos para as amostras de solos da parcela cultivada com girassol, não tendo estes resultados diferenças significativas relativamente aos solos das amostras de solo de vinha A\_V, B\_V\_1 e B\_V\_2. Eventualmente, outro tipo de práticas culturais, mais relacionadas com o tipo e quantidade de produtos fitofarmacêuticos utilizados, poderão explicar esse facto, ou, eventualmente, os valores encontrados são mais dependentes do local da amostragem, do que do produtor e tipo de cultura/práticas culturais.

Aparentemente, apenas o produtor C tem uma vinha em que os solos se destacam dos restantes com uma atividade enzimática significativamente superior. Essa resposta não acompanha os resultados do teor em MO,  $N_{Kj}$  e P extraível, que não se destacam significativamente nessa parcela. Sabendo que diferentes sistemas radiculares permitem explorar diferentes profundidades do solo e, deste modo estimular a sua diversidade e a atividade microbiana, e sendo esta uma vinha distante das dos produtores A e B, pode haver outras características do solo que permitam explicar este facto, como o tipo de argila, ou o teor em micronutrientes essenciais. É ainda necessário mencionar que os resultados apresentados neste trabalho apenas se referem à camada superficial (0-20 cm); será seguramente importante avaliar a camada 20-50 cm, que foi

também amostrada no âmbito do projeto. Relativamente ao facto de os solos da cultura anual não terem atividades da desidrogenase com diferenças significativas relativamente aos demais, sendo estes solos mobilizados, talvez as práticas culturais empregues naquela parcela, principalmente o baixo uso de produtos fitofarmacêuticos e a rotação de cultura, permitam manter a atividade microbiana dentro da mesma gama de valores dos solos não-mobilizados naquela região.



**Figura 4.7-** Valores de atividade enzimática nos solos dos diferentes locais de amostragem (média  $\pm$  desvio-padrão,  $n = 3$ ). As colunas marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (teste de Tukey HSD,  $p > 0,05$ ). Barras verdes – vinha de diferentes produtores (A, B (dois locais de amostragem) e C); barras a amarelo – rotação cultural anual girassol/alho do produtor A, em três locais de amostragem. (Fonte: projeto Fitofarmgest).

Acompanhado os resultados anteriormente discutidos, verifica-se que a atividade enzimática da desidrogenase não se correlaciona significativamente com nenhuma das propriedades físico-químicas analisadas (Tabela 4.2.). As únicas correlações significativas positivas encontradas ( $p < 0,05$ ), foram entre o teor em K extraível e o teor em matéria orgânica, e entre os teores em K e P extraíveis. A condutividade elétrica também se correlaciona positiva e significativamente, com o teor em  $N_{kj}$  e o teor em P extraível, o que pode ter a ver com o facto da aplicação de adubação à base de N e P poder aumentar a salinidade do solo.

Por isso, embora fosse de prever que a um teor mais elevado de MO correspondesse uma atividade enzimática de desidrogenase superior, isso neste caso não foi possível de ser observado.

**Tabela 4.2-** Matriz de correlações de Pearson (as correlações marcadas a vermelho são significativas a um nível de significância  $\alpha=0,05$  ( $p < 0,05$ ;  $n = 21$ )).

	pH	CE	MO	N <sub>Kj</sub>	P <sub>extraível</sub>	K <sub>extraível</sub>
CE	-0.83					
MO	0.14	0.12				
N <sub>Kj</sub>	-0.24	0.48	0.24			
P <sub>extraível</sub>	-0.59	0.49	0.39	-0.18		
K <sub>extraível</sub>	-0.26	0.16	0.59	-0.36	0.76	
Desidrogenase	0.06	-0.3	0.12	-0.38	0.36	0.43

### 4.3. Avaliação em placa das bactérias

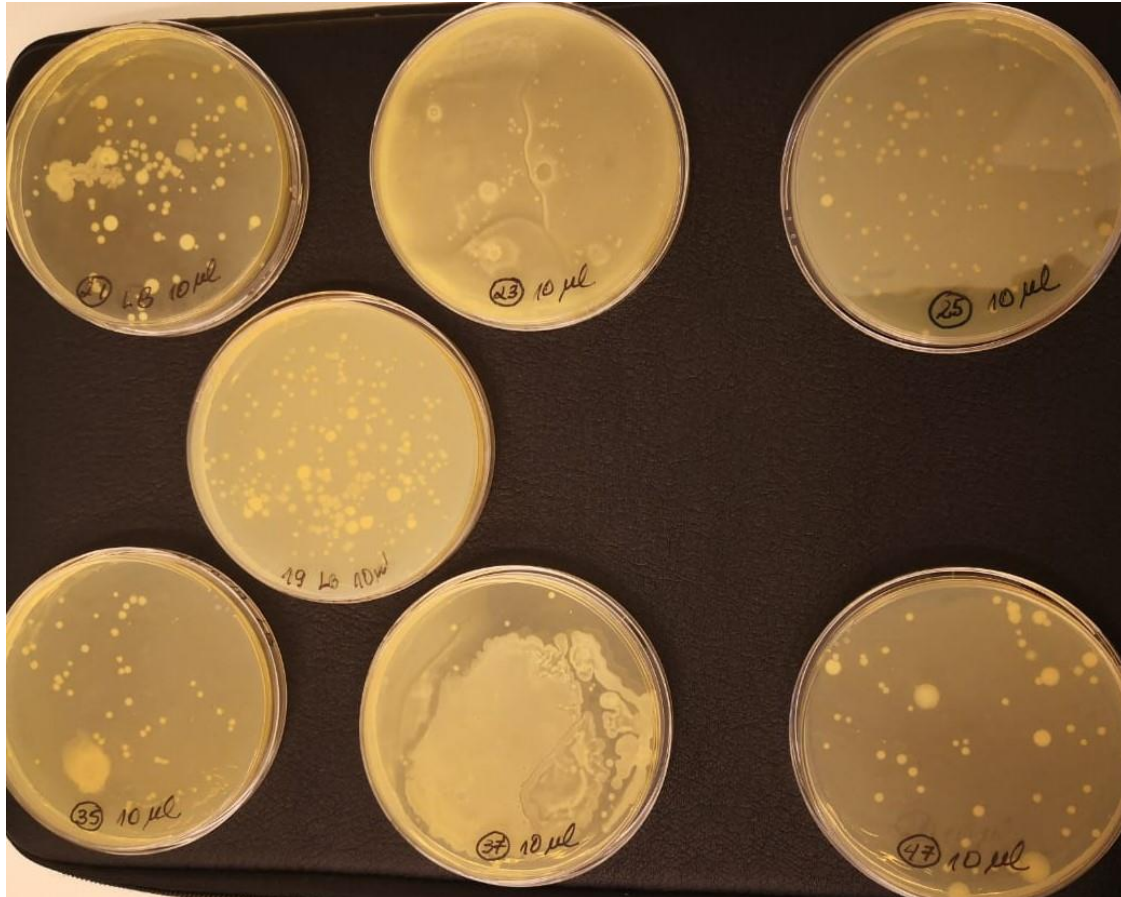
O crescimento de colónias de bactérias através do processo de plaqueamento em meio de cultura LB, após um período de 24 h de incubação à temperatura de 37°C, de 10 µl ou 100 µl de extrato de solo, pode ser observado nas (Figuras 4.8 e 4.9) respetivamente. Verificou-se um enorme desenvolvimento destes organismos, quer em placas com apenas 10 µl, bem como em placas de 100 µl de extrato de solo.

De acordo com os resultados da (Tabela 4.3), referente à contagem do número de colónias de bactérias que cresceram nas placas de Petri onde foram inoculados 10 µl ou 100 µl de extrato de cada um dos tipos de solo, notou-se claramente a existência de carga ou atividade bacteriana em todas as parcelas de solo e, de um modo geral, quase todas apresentaram um gradiente positivo em função do volume do extrato de solo, ou seja, quanto maior for o volume de extrato, maior foi o número de colónias crescidas, traduzindo-se assim em maior atividade bacteriana. A única exceção aconteceu com a amostra (A\_G\_1), em que houve uma inversão no crescimento das colónias, isto é, houve maior crescimento de colónias na placa onde se tinha espalhado 10 µl de extrato de solo do que na placa com 100 µl de extrato de solo (poderá aqui ter havido um erro de manipulação ou a suspensão do extrato não estar homogénea).

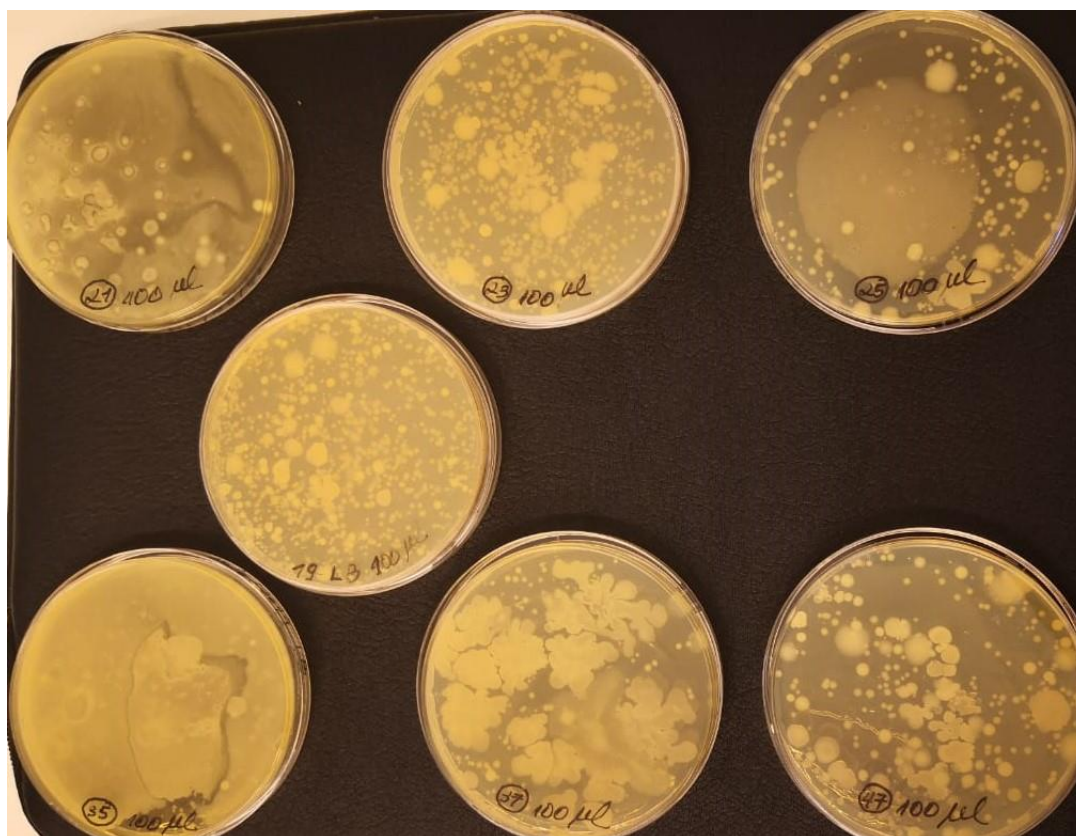
Destacaram-se ainda as amostras de solo das parcelas que tiveram maior e menor números de colónias crescidas em ambas placas de Petri, com 10 µl e 100 µl de extrato de solo, que foram (A\_V, com o maior valor, e B\_V\_2, com o menor valor), ambas cultivadas com vinha. Segundo os cadernos de campo dos agricultores, a parcela da amostra (B\_V\_2), a par da amostra (B\_V\_1), correspondem a solos da parcela submetida a um maior número de práticas agrícolas (cerca de 66 intervenções no total), traduzindo-se num maior distúrbio do solo, e, sobretudo, a frequente aplicação de produtos fitofarmacêuticos, facto que pode ter contribuído para o baixo crescimento de colónias (Lal, 2018), apesar de ter beneficiado também de alguma adubação orgânica



(MO). Por outro lado, a amostra (A\_V), teve muito menor distúrbio de solo, apenas cerca de 19 intervenções no total, incluindo a adubação orgânica (MO), um grande impulsionador da atividade microbiana (Oades, 1988; Haney et al., 2008), e reduzida aplicação de produtos fitofarmacêuticos.



**Figura 4.8-** Crescimento de colônias de bactérias em placas de LB com 10 µl de extrato de solo, após 24 h



**Figura 4.9-** Crescimento de colónias de bactérias em placas de LB com 100 µl de extrato de solo, após 24 h

**Tabela 4.3 -** Contagem do número de colónias de bactérias que se desenvolveram em placas de LB com 10 e 100 µl de extrato de solo, respetivamente, nas sete amostras analisadas.

Amostra	Volume de extrato de solo	Nº de colónias crescidas
A_V	10-100 µl	129-269
B_V_1	10-100µl	43-117
B_V_2	10-100µl	11-60
C_V	10-100µl	57-114
A_G_1	10-100µl	86-45
A_G_2	10-100µl	63-271
A_G_3	10-100µl	80-92

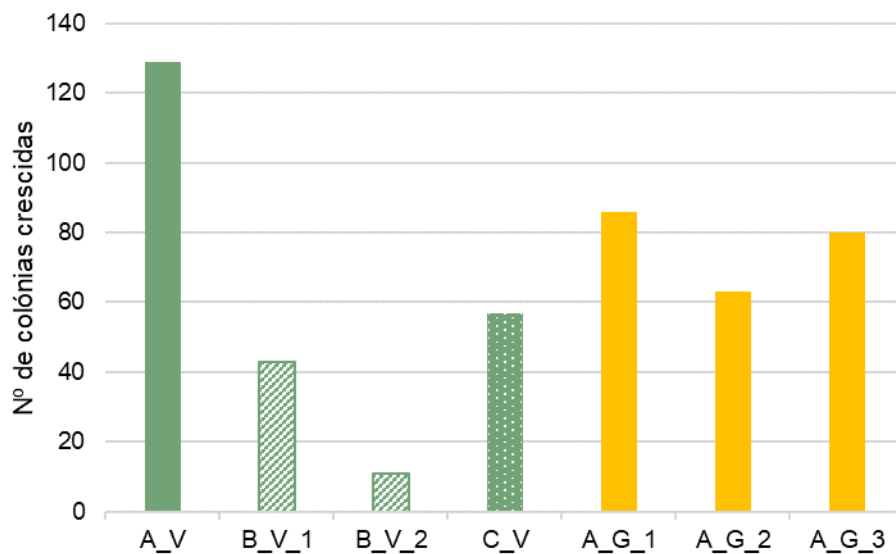
#### 4.3.1. Comparação das amostras entre si em placas de bactérias com 10 µl e 100 µl de extrato de solo

Passadas 24 h, período de incubação estabelecido para o crescimento de colónias à temperatura de 37°C, verificou-se que, de um modo geral, houve maior crescimento de colónias nas quatro amostras pertencentes ao produtor A, que incluem (A\_V, A\_G\_1, A\_G\_2 e A\_G\_3), e menor crescimento de colónias nas amostras dos outros produtores

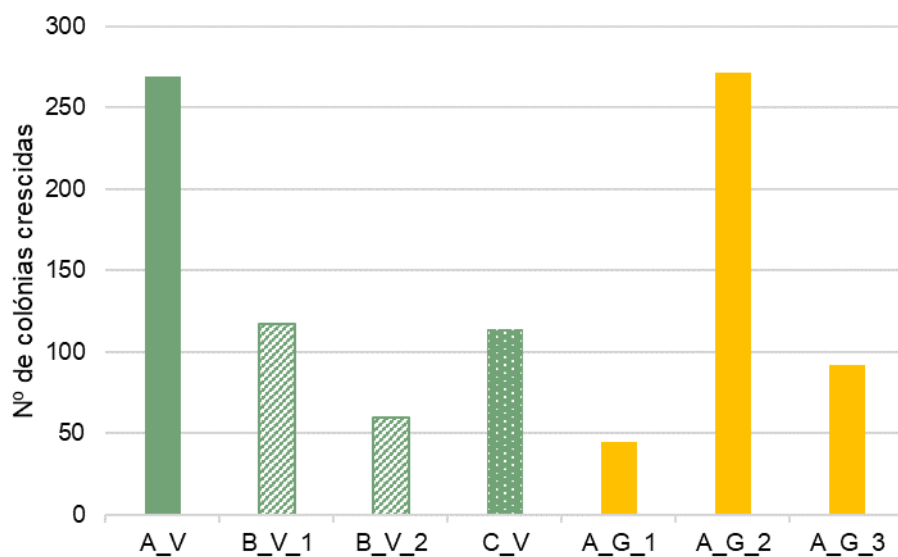
que incluem (B\_V\_1, B\_V\_2 e C\_V) (Figuras 4.10 e 4.11). Segundo os cadernos de campo, a amostra (A\_V), provém de uma parcela com cultura permanente, foi submetida a poucos tratamentos fitossanitários (nove aplicações), beneficiou de adubação orgânica e adubação inorgânica. As amostras (A\_G\_1, A\_G\_2 e A\_G\_3), são oriundas de uma única parcela com cultura anual, foi submetida a pouquíssimos tratamentos fitossanitários (duas aplicações), sem correção orgânica, mas com alguma adubação. Inversamente, as amostras (B\_V\_1, B\_V\_2 e C\_V), todas provenientes de parcelas com cultura permanente, foram submetidas a maior frequência de tratamentos fitossanitários (13 e 15 aplicações, respetivamente) e somente a parcela das amostras (B\_V\_1 e B\_V\_2), beneficiaram de adubação orgânica (MO). De acordo com esta ordem pode-se afirmar que, parcelas onde houve adubação orgânica e baixa aplicação de produtos fitofarmacêuticos apresentaram-se com maior atividade bacteriana se comparadas com parcelas onde houve adubação orgânica e alta aplicação de produtos fitofarmacêuticos. Resultados semelhantes foram relatados por Ovreas & Torsvik (1998), quando compararam a influência da rotação de culturas e da agricultura orgânica na diversidade microbiana e na estrutura da comunidade. Eles encontraram uma maior diversidade em solos que estavam sob manejo de agricultura orgânica.

Neste caso, pode-se dizer que as diferentes práticas culturais (manejo/uso do solo), aplicadas a cada uma destas parcelas, fundamentalmente práticas relacionadas com a adubação orgânica e sua quantidade, bem como a frequência de tratamentos fitossanitários, foram fatores principais que influenciaram no teor de bactérias nas diversas parcelas, tal como afirmam Brady & Weil (2017), que a biomassa total do solo, está, geralmente, relacionada com a quantidade de matéria orgânica presente.

Através da Figura 4.10, é possível verificar que a quantidade de colónias crescidas em amostras cujas as parcelas foram menos intervencionadas durante o ciclo (A\_V, A\_G1, A\_G\_2 e A\_G\_3), foi maior que noutras (B\_V\_1, B\_V\_2 e C\_V), cujas parcelas foram mais perturbadas, essencialmente com a aplicação de pesticidas, observando-se, portanto algumas diferenças entre si que podem ter sido provocadas pela natureza e complexidade ambiental de cada solo e pelas diferentes práticas culturais.



**Figura 4.10-** Número de colónias de bactérias obtidas em placas de LB, com 10 µl de extrato de solo, para as sete amostras avaliadas, após 24 h.



**Figura 4.11-** Número de colónias de bactérias obtidas em placas de LB, com 100 µl de extrato de solo, para as sete amostras avaliadas, após 24 h.

De um modo geral, as amostras de solo do produtor A, suplantaram-se sobre as amostras dos outros dois produtores (B e C), em ambos os volumes de 10 e 100 µl de extrato de solo, apresentando maior número de colónias de bactérias crescidas, quer com a amostra da parcela cultivada com vinha, quer com os solos da parcela cultivada

por girassol. Em ambas as parcelas houve baixos tratamentos fitossanitários. É de referir, no entanto, que esta avaliação ocorre por defeito, uma vez que não contempla os microrganismos que não crescem em condições artificiais de cultura.

#### 4.4. Avaliação em placa de fungos

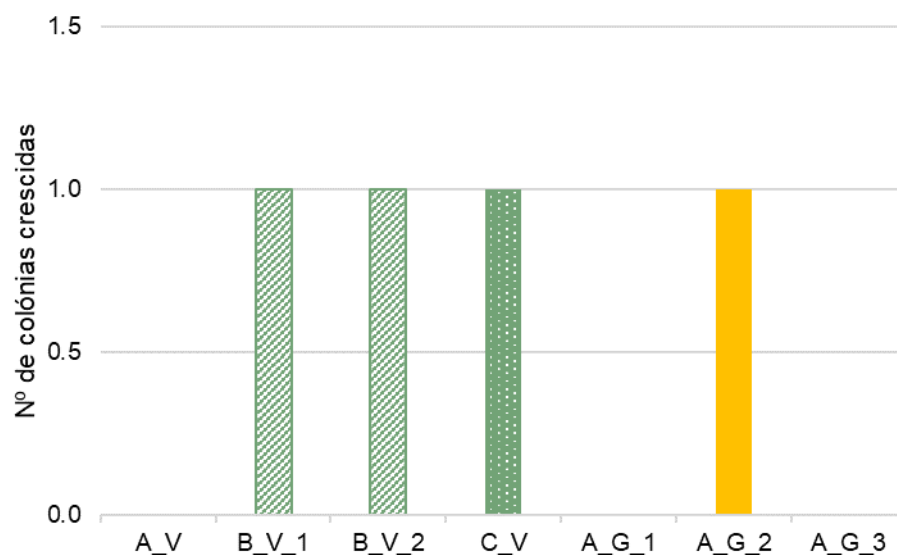
Os resultados relativos ao crescimento de fungos pelo processo de plaqueamento em placas de Petri contendo meio de cultura PDA, depois de 24 h de incubação à temperatura ambiente, encontram-se na (Tabela 4.4), e nas Figuras 4.12 e 4.13. Nelas pode verificar-se que o número de colónias obtidas, tanto em placas com 10 µl como em placas com 100 µl de extrato de solo, é menor, se comparado com o número de colónias de bactérias para as mesmas diluições de solo, uma vez que os fungos são microrganismos de crescimento mais lento, e as bactérias são o maior grupo de microrganismos do solo (Costa, 1975). Porém, confirma-se a existência de fungos em quase todas as amostras das parcelas de solo avaliadas e, também, com um gradiente positivo, tal como o que se encontrou para as bactérias, isto é, maior número de colónias nos plaqueamentos com 100 µl de extrato.

**Tabela 4.4** - Contagem do número de colónias de fungos que se desenvolveram em placas de PDA + 10 µl/ml de canamicina com 10 e 100 µl de extrato de solo, respetivamente, nas sete amostras analisadas.

Nº da amostra de solo	Volume de extrato de solo	Nº de colónias crescidas
A_V	10-100µl	0-19
B_V_1	10-100µl	1-5
B_V_2	10-100µl	1-0
C_V	10-100µl	1-26
A_G_1	10-100µl	0-5
A_G_2	10-100µl	1-24
A_G_3	10-100µl	0-0

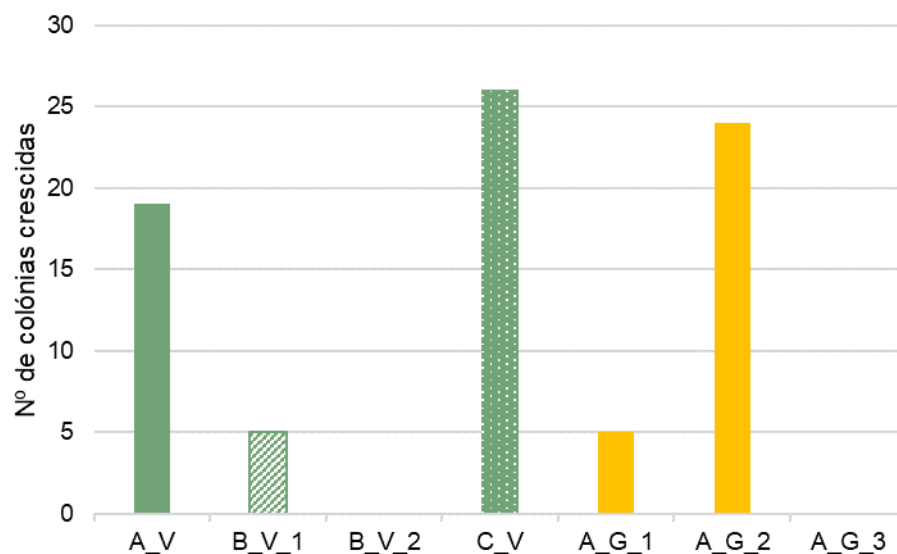
##### 4.4.1. Comparação das amostras entre si em placas de fungos com 10 µl e 100 µl de extrato de solo

Com o plaqueamento de 10 µl de amostra de solo, o número de fungos obtidos, após 24 h de incubação, foi muito pequeno, e ausente nas amostras A\_V, A\_G\_1 e A\_G\_3, (Figura 4.12).



**Figura 4.12-** Número de colónias de fungos obtidas em placas de PDA, com 10 µl de extrato de solo, com 10 µl/ml de canamicina, após 24 h.

A tendência de variação entre amostras, para o número de colónias de fungos obtidas quase se repetiu, relativamente às colónias de bactérias obtidas nas diferentes amostras, com exceção da amostra (A\_G\_3), onde não se registou crescimento em nenhuma das placas, com incubação de 10 ou 100 µl de amostra de solo (Figuras 4.12 e 4.13), mas, ainda assim, as três restantes amostras do produtor A superaram as outras de outros produtores (B e C), apesar da amostra (C\_V) se destacar entre todas.



**Figura 4.13-** Número de colónias de fungos obtidas em placas de PDA + 10 µl/ml de canamicina, com 100 µl de extrato de solo, após 24 h de incubação.

## 4.5. Avaliação molecular

### 4.5.1. Avaliação da qualidade e quantidade do DNA do solo

A qualidade de cada extrato de DNA do solo foi determinada espectrofotometricamente usando um espectrofotômetro **GeneQuant pro** (RNA/DNA Calculator). De acordo com os gráficos fornecidos pelo espectrofotômetro, de todas as amostras avaliadas (Figuras no Anexo A), somente uma amostra apresentou um extrato com uma curva a sugerir DNA suficientemente puro, cuja razão  $A_{260}/A_{280}$  foi de 1,80 conforme descrito na literatura por Hermans et al. (2018), nomeadamente a amostra A\_G\_3. Por outras palavras, de todas as amostras avaliadas, esta foi a amostra cujo extrato de DNA se apresentou com menos contaminantes, demonstrando uma curva de DNA de melhor qualidade e as razões  $A_{260}/A_{230}$  e  $A_{260}/A_{280}$  confirmaram o baixo teor de contaminantes e médio de teor de DNA, como tal se pode observar nas (Figuras A.0.13 e A.0.14).

Nas restantes amostras, cujos gráficos também podem ser encontrados no Anexo A, a partir da (Figura A.0.2), confirma-se a presença de DNA microbiano em todos extratos de solo, claramente com algumas diferenças entre si, mas de pouca qualidade, muito inferior ao desejável, indicando desta maneira a presença de contaminantes nestes extratos onde se incluem polifenóis, lípidos, proteínas ou polissacáridos, que podem inibir a atividade das enzimas. Estas impurezas podem eliminar-se usando várias técnicas, sendo, no entanto, trabalhoso e oneroso (Cheng et al., 2016; Satyanarayana et al., 2017; Hermans et al., 2018).

A Tabela 4.5 mostra os resultados obtidos na avaliação espectrofotométrica de todas amostras de solo, usando o protocolo de isolamento de DNA do solo *DNeasy® PowerSoil® Kit*.



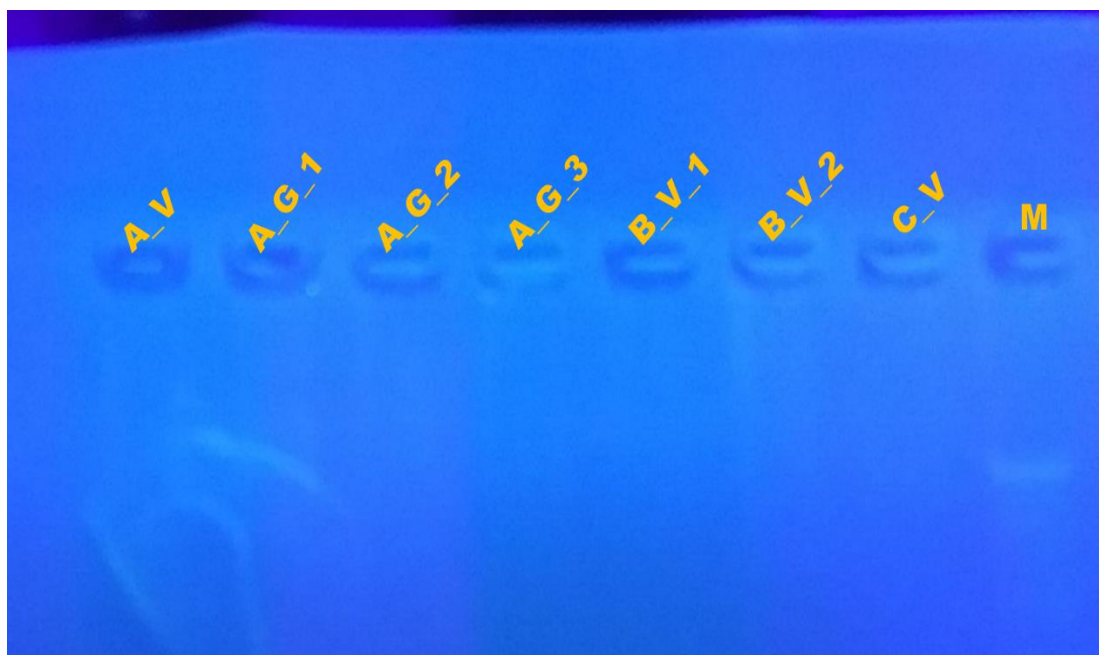
**Tabela 4.5-** Razões dos valores de absorção de ácido húmico, DNA e proteína por espectrofotômetro

Nome das amostras	Concentração de DNA de solo (ng/μl)	OD 260/230	OD 260/280
A_V	27,5	0,568	1,75
B_V_1	27	0,5	1,44
B_V_2	18,5	0,296	1,140
C_V	37	0,73	1,470
A_G_1	32	0,794	1,588
A_G_2	20	0,621	1,636
A_G_3	32,5	0,794	1,80

Neste estudo, as proporções  $A_{260} / A_{230}$  de todas as amostras de DNA foram inferiores a 1,80, isto é, apresentaram-se com baixa pureza de DNA, atendendo também aos requisitos para PCR. As proporções variaram de 0,5 a 0,794. As razões  $A_{260} / A_{280}$  de todas as amostras de DNA falharam também nos valores desejados, exceto a amostra A\_G\_3 que apresentou valores muito mais próximos do limiar (Hermans et al., 2018).

A degradação e quantidade dos DNAs do solo foram também verificadas por eletroforese em gel de agarose a 1,2% e posteriormente sua visualização num transiluminador UV, tal como demonstra a (Figura 4.14). A não visualização de bandas de DNA em nenhuma das pistas que continham extratos de DNA do solo, apenas se vendo as bandas do marcador, indicia que a avaliação espectrofotométrica fez uma sobreavaliação do DNA presente nos extratos. Este resultado advém da baixa eficiência do método de extração, condicionando à partida o resultado das reações de amplificação.



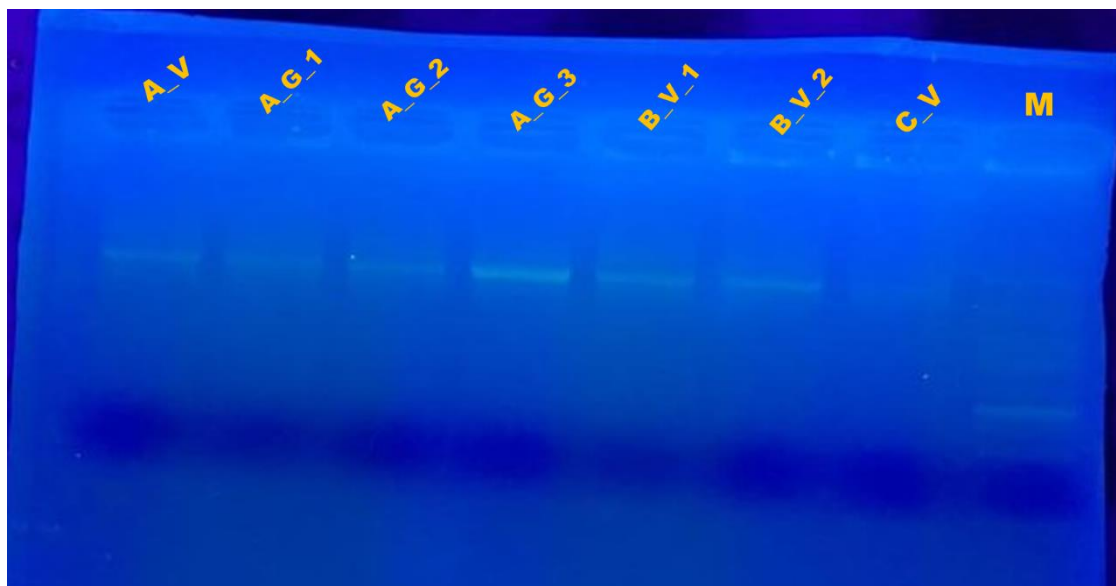


**Figura 4.14-** Observação do tamanho de DNAs, após a sua extração pelo protocolo de isolamento (Dneasy PowerSoil Kit), onde os extratos foram colocados a correr em gel de agarose a (1,2%), por ordem de produtores e na última pista M: Marcador  $\lambda$ HindIII EcoRI.

#### 4.5.2. Avaliação molecular da presença de DNA bacteriano nos extratos de DNA dos solos amostrados por amplificação via PCR

Após os 35 ciclos de amplificação, os produtos da PCR foram sujeitos a uma eletroforese em gel de agarose a 2% durante 40 minutos, a seguir efetuou-se a sua visualização num transiluminador sob a luz UV, como se pode observar através da (Figura 4.15). Depois da visualização do gel de agarose pode-se afirmar claramente que há presença de atividade bacteriana em todas as sete amostras de solo devido a visibilidade de bandas de 1500 pb de DNA no gel de agarose, embora com diferentes intensidades. Dentro das sete amostras de solo avaliadas, ao fazer-se uma comparação a partir da amostra que apresentou bandas com melhores intensidades de DNA para a amostra com menos intensidades de DNA no gel de agarose, observou-se a seguinte ordem de amostras: (A\_G\_3, A\_V, B\_V\_1, B\_V\_2, A\_G\_1, A\_G\_2, e C\_V), e houve duas que mereceram destaque, nomeadamente as amostras (A\_G\_3 e C\_V). A amostra (A\_G\_3), foi colhida da parcela cultivada por girassol e mereceu destaque porque as suas bandas de DNA no gel de agarose apresentaram-se com melhor e maiores intensidades em detrimento das outras, enquanto que a amostra (C\_V), proveniente de uma das parcelas cultivada por vinha apresentou-se de forma inversa, ou seja, apresentou bandas de DNA com menores intensidades em gel de agarose em relação

as outras, o que pode significar que haja maior e melhor atividade bacteriana na parcela da amostra (A\_G-3), do que noutras, e menor atividade bacteriana na parcela da amostra (C\_V), em detrimento das restantes parcelas. Este resultado vem ao encontro do que se verificara na experiência de plaqueamento, corroborando plenamente os resultados obtidos. Fazendo uma análise agronómica, este destaque pode ser explicado principalmente pelo tipo de práticas culturais (maneio/uso solo), implementadas em cada uma das parcelas, tipo de cultura (anual ou permanente), tipo de rega, cobertura do solo e o compasso (Lal & Kimble, 1997; Sainjul et al., 2006; West & Six, 2007; Bhattacharyya et al., 2009). Não obstante ao que foi dito do ponto vista agronómico, depois de se consultar os cadernos de campo dos produtores das amostras em causa (A\_G-3 e C\_V), constatou-se a consonância dos dados dos cadernos com a interpretação apresentada, pois a parcela da amostra (C\_V), foi das mais intervencionadas principalmente por tratamentos fitossanitários (cerca de 15 aplicações), enquanto que a amostra (A\_G\_3), teve apenas dois tratamentos fitossanitários, sendo esta uma prática que reduz a presença de microrganismos do solo quando feita com alguma frequência (Sinsabaugh, 2010). Além disso, a parcela da amostra (C\_V), foi ocupada por uma cultura com baixa área foliar oferecendo pouca protecção ao solo, fornece pouca disponibilidade de resíduos vegetais ao solo em relação ao girassol, a rega era localizada, outro fator chave para a presença de microrganismos no solo e tem um compasso superior ao girassol. Porém, todos estes aspectos contribuem para a redução da biomassa microbiológica nos solos agrícolas e na baixa qualidade dos solos (Truu 2008).



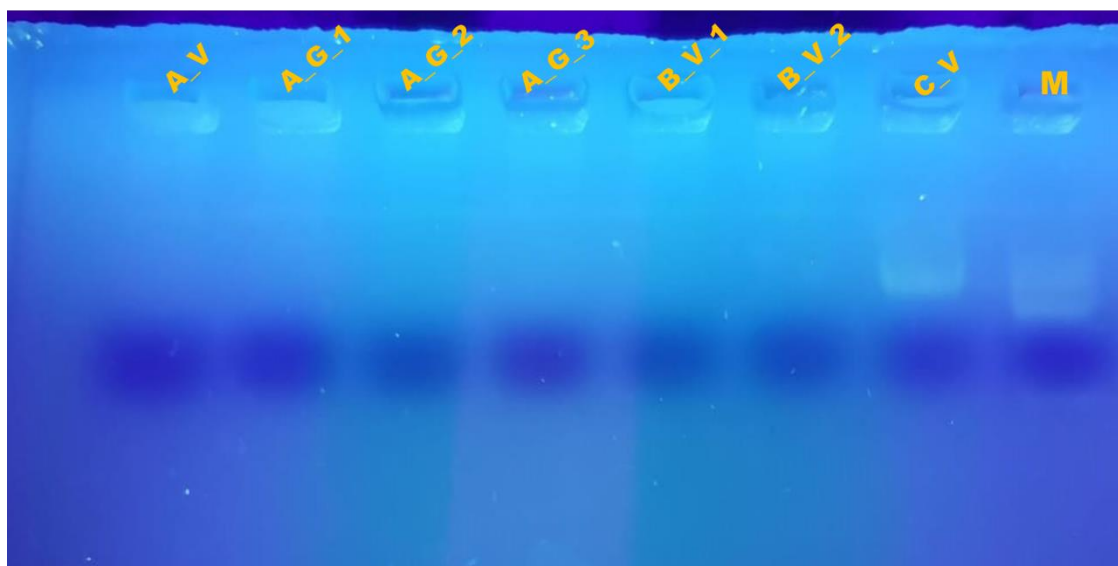
**Figura 4.15-** Produto amplificado do DNA genômico otimizado com primers de bactérias, onde os extratos de DNA estão organizados por ordem de produtores (A\_V, A\_G\_1, A\_G\_2, A\_G\_3, B\_V\_1, B\_V\_2 e C\_V), e na última pista M: Marcador GeneRuler 100pb Plus.

#### 4.5.3. Avaliação molecular da presença de fungos por amplificação via PCR de fragmentos específicos de fungos a partir do extrato de DNA do solo

A avaliação molecular da presença de fungos por amplificação via PCR teve procedimentos similares aos das bactérias, mas não se pode dizer o mesmo relativamente aos resultados. Numa primeira fase, depois de observar-se os produtos da PCR corridos em gel de agarose a 2% num transiluminador sob a luz UV, verificou-se que apenas uma amostra das sete avaliadas apresentou bandas de 650 pb de DNA, que foi a amostra (C\_V), localizada na pista 7, como se pode ver na (Figura 4.16). Repetiu-se o processo para eliminar a hipótese de qualquer erro de manipulação e ao visualizar-se novamente no transiluminador sob a luz UV, já não voltaram a aparecer bandas de DNA em nenhuma das pistas do gel de agarose para além das bandas do marcador. Foi-se experimentando várias vezes, aumentando e diminuindo as quantidades de extrato de DNA para o processo da PCR, mas sem sucesso. Portanto, pensou-se ter ocorrido um problema de inibição do DNA por contaminantes (açúcares, polifenóis, proteínas, lípidos, polissacáridos), e decidiu-se purificar os extratos de DNA. Para tal, adicionou-se 400 µl de TrisHCl 10 mM pH 8,5 e 200 µl de NaCl 5 M aos extratos

de DNA, incubou-se a 65°C por 30min, adicionou-se acetato de sódio 3 M pH 5,2, precipitou-se com etanol absoluto (2,5 volumes), incubou-se a -80°C por 1h:30min, centrifugou-se a 13000xg a 4°C por 20min, retirou-se grande parte do sobrenadante, lavou-se com etanol a 70%, agitou-se suavemente por 10 min, centrifugou-se a 13000g a 4°C por 20min e deixou-se evaporar o etanol na estufa para melhor aproveitamento do *pellet*. Depois, adicionaram-se 10 µl de água esterilizada ao *pellet*, voltou-se a verificar a sua qualidade e quantidade através do espectrofotômetro e gel de agarose a 1,2%, fez-se a PCR e sua visualização no transiluminador, mas também não se verificaram bandas de DNA destes organismos.

Voltou-se a purificar os extratos de DNA de forma semelhante, mas juntando-se um passo de extração com clorofórmio: álcool isoamílico para eliminar proteínas e incubou-se a -80°C por 2h. Depois adicionou-se 5 µl de água de esterilizada ao *pellet*, fez-se a PCR e colocou-se a correr em gel de agarose e novamente não se visualizou bandas de DNA.



**Figura 4.16-** Produto amplificado do DNA genômico otimizado com primers de fungos, onde os extratos de DNA estão organizados por ordem de produtores (A\_V, A\_G\_1, A\_G\_2, A\_G\_3, B\_V\_1, B\_V\_2 e C\_V), e na última pista M: Marcador GeneRuler 100pb Plus.

Assim, pese embora as tentativas de melhorar a qualidade dos extratos de DNA, a amplificação de fragmentos específicos de fungos a partir dos extratos de DNA não funcionou de forma eficaz. Pode também ter acontecido degradação do DNA pelos processos de congelação e descongelação inerentes às diferentes tentativas de amplificação.

#### 4.6. Comparação entre avaliação em placa e avaliação molecular de bactérias e fungos

Apesar de ambos os métodos serem laboratoriais e terem a mesma finalidade (avaliar a atividade microbiana, para o nosso caso do solo), cada método tem os seus próprios problemas e benefícios, desde o modo de execução inicial até a obtenção de resultados, mas cada um é capaz de indicar diferenças entre os solos. A avaliação em placa através do processo de plaqueamento é naturalmente o método mais fácil entre eles, ou seja, é mais barato e implica menos conhecimento, mas também é menos específico, algo moroso (lento), desde a sua execução à apresentação de resultados e mais propenso a contaminações caso não se tomem as devidas precauções durante o processo no laboratório. A dificuldade de identificar colónias isoladas pode também ser uma limitação, induzindo resultados não totalmente corretos. O plaqueamento de volumes de extrato reduzidos visou obviar esta limitação, reduzindo a densidade por placa. No entanto, a limitação do não crescimento de microrganismos que só cresçam no hospedeiro mantém-se, sendo inerente ao método. Opostamente, o método de avaliação molecular é mais rápido, mais específico, permite diferenciar melhor os organismos (se se lhe juntar um passo de sequenciação a seguir à amplificação), apesar de ser mais caro e exigir maior conhecimento da técnica.

Cada um dos métodos teve a sua utilidade, cujo propósito final era encontrar resultados equivalentes, deste modo podermos afirmar a conciliabilidade entre eles, e/ou a sua complementaridade. De acordo com os resultados obtidos a partir da avaliação por plaqueamento, confirmou-se a existência de carga ou atividade microbiológica de bactérias e fungos em todas as amostras de solo analisadas, embora em diferentes proporções, que pode ter sido influenciado pelas diferentes práticas culturais (manejo do solo), a que as parcelas foram submetidas. Quanto à avaliação molecular, os seus resultados foram quase análogos aos da avaliação em placa, exceto a não visualização de bandas de DNA de fungos em gel de agarose após o processo da PCR. De facto, vários autores referem que os organismos que se encontrem em pequena quantidade, ou pouco cultiváveis, podem ser difíceis de detetar dentro da massa do DNA do solo extraído (Turco et al., 1994).

De forma resumida, os resultados das bactérias conquistados por plaqueamento concordaram com o método de amplificação de *primers* específicos das bactérias (PCR das bactérias), onde se verificou a presença de atividade ou carga bacteriana em todas as amostras avaliadas, tanto num como no outro método. Os resultados dos fungos granjeados pelo processo de plaqueamento onde se confirmou a presença de atividade

ou carga microbiológica de fungos em quase todas as amostras avaliadas, não puderam comparar-se ou contrapor-se com os do método de amplificação de *primers* específicos de fungos (PCR de fungos), devido a não visualização de bandas de DNA em gel de agarose.

#### **4.7. Comparação dos extratos de DNA das diferentes amostras**

Tendo em conta as curvas dos gráficos apresentados pelo espectrofotómetro, pode dizer-se que os gráficos com maiores concentrações e com melhor qualidade de DNA encontram-se na seguinte ordem de amostras: (A\_G\_3, A\_V, A\_G\_1, A\_G\_2, B\_V\_2, B\_V\_1 e C\_V). Estes resultados podem estar relacionados com a abundância microbiana (indo ao encontro das observações em placa de LB, por exemplo), mas também com a eficiência do processo de extração, influenciando diretamente o sucesso da abordagem molecular. Neste caso, verificou-se que os extratos com melhores curvas funcionaram melhor na PCR (exemplo do extrato da amostra A\_V), o que poderá decorrer de uma menor presença de inibidores e/ou de maior quantidade de DNA. Ambos os aspetos podem contribuir para bandas mais intensas.

Em termos agronómicos, significa dizer que não basta suprir ou fornecer aos solos agrícolas MO como garantia de restauração ou melhoria da qualidade do solo, é necessário considerar também outras medidas da Agricultura de Conservação, incluindo a manutenção do coberto vegetal permanente sobretudo em épocas críticas, rotações de cultura adequadas com diferentes sistemas radiculares e evitar práticas de manejo do solo que causem a remoção da cobertura da superfície e a perda do carbono orgânico do solo (SOC), tal como a racionalização da aplicação de pesticidas. De facto, o uso excessivo de fitoquímicos, para além de causar impactos negativos na população microbiana presente no solo (com ou sem MO), e noutros serviços dos ecossistemas (qualidade do ar e da água), obriga também à passagem de máquinas agrícolas e, deste modo, provoca maior compactação do solo, que se traduz na destruição dos agregados do solo. Esta destruição leva a uma drástica redução da macroporosidade do solo, provocando problema de baixo arejamento, baixa capacidade de infiltração, retenção e drenagem de água, e aumentando o escoamento superficial e a perda de solo (DGADR, 2017).

#### **4.8. Comparação entre a caracterização da atividade microbiana e atividade enzimática da desidrogenase**

Ao analisar os resultados obtidos na caracterização da atividade microbiana de bactérias e fungos, realizadas nos laboratórios de Biologia Molecular e Micropropagação de Horticultura do ISA, verificou-se que, na generalidade, as amostras (A\_V, A\_G\_1, A\_G\_2 e A\_G\_3), salvo algumas exceções, sempre demonstraram ter maior e melhor carga microbiológica de bactérias e fungos. Isto pode ser observado tanto na quantidade de colónias crescidas nas placas destas amostras, para ambos os organismos, através do plaqueamento quer, também, por apresentarem bandas com melhores intensidades de aquando da migração dos produtos da PCR em gel de agarose.

Os resultados observados nos laboratórios de Beja através determinação da atividade enzimática da desidrogenase (Figura 4.7), não foram tão concordantes com os resultados obtidos através dos métodos realizados nos laboratórios do ISA, quanto seria de prever. Esta diferença pode resultar do facto de serem amostras recolhidas em datas diferentes (i.e. a atividade da desidrogenase foi medida em amostras de solo recolhidas no final do ciclo cultural de ambas as culturas - final do verão/início de outono de 2018 – enquanto que os métodos de biologia molecular utilizaram amostras recolhidas no início do seu ciclo cultural – primavera 2019), mas, principalmente, pelo facto das amostras para a caracterização microbiológica terem sido armazenadas no frigorífico durante muito tempo, o que pode ter causado a perda da viabilidade dos microrganismos em certas amostras.



## 5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A classe textural dos solos analisados variou entre franco, franco-argiloso e argilo-limoso (textura média). São solos pouco alcalinos, com baixa salinidade, caracterizados por uma fertilidade baixa, em que a aplicação de fertilizantes minerais ou orgânicos é necessária quando se pretende uma intensificação da produção, principalmente quando se muda de agricultura de sequeiro para agricultura de regadio. De facto, os teores de MO nestes solos variam entre muito baixos a médios, sendo este um fator chave da fertilidade e qualidade dos solos. Seria também aconselhada uma correção do pH a níveis adequados para as culturas (próximo da neutralidade) (LQARS, 2006). Os teores de  $P_2O_5$  extraível apresentaram-se com valores médios a muito altos, e os teores de  $K_2O$  extraível também apresentaram valores muito altos nos solos de vinha, com diferenças significativas relativamente aos solos com cultura anual de girassol, que se mantiveram em teores alto ou médios.

Depois de analisar os métodos que nos propusemos avaliar para testar a influência de diferentes práticas culturais sobre a atividade microbiana do solo (qualidade microbiológica do solo), em diferentes parcelas de solos agrícolas, este estudo demonstrou que diferentes práticas culturais do solo modificaram significativamente a atividade microbiológica nas parcelas estudadas. De facto, a atividade microbiana, em parte, aumentou no solo sob reduzida aplicação de produtos fitofarmacêuticos, com rotação cultural e aplicação de matéria orgânica, quando comparado com o solo sob elevada aplicação de produtos fitofarmacêuticos e falta de matéria orgânica. Assumidamente, a elevada aplicação de produtos fitofarmacêuticos afeta consideravelmente a densidade, a biomassa e a composição comunitária da população de microrganismos no solo, independentemente se for aplicada ou não matéria orgânica. Resumidamente, o manejo do solo e as práticas culturais são o equilíbrio-chave da diversidade e atividade microbiana e, simultaneamente, da qualidade dos solos agrícolas.

Tanto a avaliação por plaqueamento quanto a avaliação molecular, foram importantes para a caracterização da atividade microbiana nas diferentes parcelas de solo, demonstrando cada uma as suas particularidades durante o processo, mas, de forma geral, as duas técnicas foram coincidentes e complementares uma da outra, pois expressaram resultados praticamente congruentes. A metodologia do plaqueamento é tecnicamente menos exigente, mas faz uma avaliação por defeito. Por outro lado, a abordagem molecular é tecnicamente mais exigente, e muito dependente da qualidade do extrato de DNA, mas pode conferir um resultado mais rigoroso, tendo ainda a



vantagem adicional de permitir avançar de forma expedita para a avaliação da diversidade genética das populações microbianas.

Os resultados da atividade microbiana alcançados pelos métodos realizados no Instituto Superior de Agronomia não foram muito concordantes com os resultados obtidos pelo método utilizado na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja, ou seja, as amostras que se apresentaram com melhor atividade biológica nos laboratórios de Beja através da determinação da atividade enzimática da desidrogenase, não estiveram em conformidade com as amostras que manifestaram maior carga microbiológica e/ou atividade microbiana de (bactérias e fungos), nos laboratórios do ISA, por meio da avaliação em placa e/ou molecular. Uma das três abordagens analisadas não convergiu tão bem com os resultados das outras, conferindo alguma insegurança quando se torna necessário recomendar só uma delas. De facto, os resultados podem ter sido divergentes apenas pelo facto de as amostras terem sido recolhidas em momentos diferentes, ou pela sua conservação prolongada, sendo, no entanto, todas estas técnicas válidas na avaliação da qualidade biológica de um solo.

Tendo em conta as conclusões formuladas, em função dos resultados obtidos, deixam-se algumas recomendações para um próximo estudo:

- Através do método molecular, fazer uma avaliação mais específica para identificar o tipo de microrganismos que se mantiveram em solos sob baixa e elevada aplicação de produtos fitofarmacêuticos e procurar estabelecer a diferença entre eles;
- Fazer uma reavaliação molecular dos fungos por amplificação de DNA (PCR), utilizando outra técnica de isolamento de DNA, ou outro *kit* comercial, de modo a conseguir maior sucesso nas reações de amplificação;
- Aprofundar e melhorar este estudo (utilizando as mesmas culturas e práticas culturais), mas usar locais de ensaios diferentes, com diferentes condições de clima e solo, e num período de tempo mais alargado. Porém, quando se tentam comparar as respostas de métodos diferentes, tentar sempre utilizar amostras recolhidas no mesmo momento, e com o menor tempo de conservação possível.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahams, P. W. 2002.** Soils: their implications to human health. *The Science of the Total Environment*. Vol. 291, pp. 1–32.
- Alvarenga, P. 2009.** *Utilização de resíduos orgânicos biodegradáveis na remediação de solos degradados por actividades mineiras*. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. : s.n., 2009. Tese de Doutoramento.
- Bai, Z., Caspari, T., Gonzalez, M. R., Batjes, N. H., Mäder, P., Bünemann, E. K., de Goede, R., Brussaard, L., Xu, M., Ferreira, C. S. S., Reintam, E., Fan, H., Mihelič, R., Glavan, M., Tóth, Z. 2018.** Effects of agricultural management practices on soil quality: A review of long-term experiments for Europe and China. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. Vol. 265, pp. 1-7.
- Bhattacharyya, R., Prakash, V., Kundu, S., Srivastva, A. K., Gupta, H. S. 2009.** Soil aggregation and organic matter in a sandy clay loam soil of the Indian Himalayas under diferente tillage and crop regimes. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. Vol. 132, pp. 126-134.
- Bloem, J., Schouten, A.J., Sorensen, S.J., Rutgers, M., van der Werf, A., Breure, A.M. 2005.** *Monitoring and evaluating soil quality. In: Bloem, J.(Ed). Microbiological Methods for assessing soil quality.*
- Bongiorno, G., Bünemann, E. K., Oguejiofor, C. U., Meier, J., Gort, G., Comans, R., Mäder, P., Brussaard, L., de Goede, R. 2019.** Sensitivity of labile carbon fractions to tillage and organic matter management and their potential as comprehensive soil quality indicators across pedoclimatic conditions in Europe. *Ecological Indicators*. Vol. 99, pp. 38-50.
- Bremner, J. 1960.** Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *The Journal of Agricultural Science*. Vol. 55 (1), pp. 11-33.
- Brookes, P. C., Cayuela, M. L., Contin, M., De Nobili, M., Kemmitt, S. J. Mondini, C. 2008.** The mineralisation of fresh and humified soil organic matter by the soil microbial biomass. *Waste Management*. Vol. 28, pp. 716–722.
- Bucella, P. 2015.** Uso sustentável da terra na União Europeia. In: Dimas, B & Dinis, E. (Eds). CULTIVAR Cadernos de Análise e Prospetiva. GPP (Gabinete de Planeamento, Políticas e administração geral), pp. 13-20. Lisboa

**Bünemann, E. K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R. E., De Deyn, G., de Goede, R., Flesskens, L., Geissen, V., Kuyper, T.W., Mäder, P., Pulleman, M., Sukkel, W., van Groenigen, J.W., Brussaard, L. 2018.** Soil quality – A critical review. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 120, pp. 105-125.

**Campos, J. A., Peco, J. D., García-Noguero, E. 2019.** Antigerminative comparison between naturally occurring naphthoquinones and commercial pesticides. Soil dehydrogenase activity used as bioindicator to test soil toxicity. *Science of the Total Environment*. Vol. 694- 133672.

**Cardoso, J. C. 1974.** Nova versão. Boletim de Solos do SROA, Lisboa, nº 17, janeiro, pp. 14-46.

**Chander, K & Brookes, P. C. 1991.** Is the dehydrogenase activity invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 23, pp. 909-915.

**Cheng, F., Hou, L., Woeste, K., Shang, Z., Peng, X., Zhao, P., Zhang, S. 2016.** Soil pretreatment and fast cell lysis for direct polymerase chain reaction from forest soils for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of fungal communities. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 47, pp. 817-827.

**Costa, J. B. 1975.** *Caracterização e constituição do solo*. s.l. : Fundação Calouste Gulbenkian., 1975.

**Dick, R. P. 1994.** Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: Doran, J. W., Coleman, D. C., Bezdicsek, D. F., Steward, B. A. *Defining Soil Quality For a Sustainable Environment*. SSSA (Soil Science Society of America), pp. 107-124. Madison

**Doran, J. W & Parkin, T. B. 1994.** Defining and assessing soil quality. In: Doran, J. W., Coleman, D. C., Bezdicsek, D. F., Steward, B. A. *Defining Soil Quality For a Sustainable Environment*. SSSA (Soil Science Society of America), pp. 3-21. Madison

**Doran, J. W & Zeiss, M. R. 2000.** Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*. Vol. 15, pp. 3-11.

**Ernst, G & Ermeling, C. 2009.** Impact of five different tillage systems on soil organic carbon content and the density, biomass, and community composition of earthworms after a ten year period. *European Journal of Soil Biology*. Vol. 45, pp. 247-251.

**FAO. 2008.** An international technical workshop. Investing in sustainable crop intensification. The case for improving soil health. *Integrated Crop Management*. 22–24 de July de 2008, Vol. 6.

**Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., Seoane, S. 2005.** Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 37, pp. 877-887.

**Girvan, M. S., Bullimore, J., Pretty, J. N., Osborn, A. M., Ball, A. S. 2003.** Soil type is the primary determinant of the composition of total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 69, pp. 1800-1809.

**Graber, D.R., Jones, W.A. e Johnson, J.A. 1995.** Human and ecosystem health. *J. Agromedicine* .

**Hamed, J., Danaiefar, M., Moghimi, H. 2016.** Rapid and efficient method for environmental dna extraction and purification from soil. *Journal of microbiology, biotechnology and food science*. Vol. 5 (6)., pp. 530-533.

**Haney, R. L., Haney, E. B., Smith, D. R., Harmel, R. D., White, M. J. 2018.** The soil health tool—Theory and initial broad-scale application. *Applied soil Ecology*. Vol. 125, pp. 162-168.

**Haney, R.L., Brinton, W.F., Evans, E. 2008.** Estimating soil C, N, and P mineralization from short-term CO<sub>2</sub> respiration. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* Vol. 39, pp. 2706-2720.

**Hermans, S. M., Buckley, H. L., Lear, G. 2018.** Optimal extraction methods for the simultaneous analysis of DNA from diverse organisms and sample types. *Wiley: MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES*. Vol. 18, pp. 557-569.

**Hermle, S., Anken T., Leifeld, J., Weiskopf, P. 2008.** The effect of the tillage system on soil organic carbon content under moist, cold-temperate conditions. *Soil & Tillage Research*. Vol. 98, pp. 94-105.

**Islam, K. R & Weil, R. R. 2000.** Soil quality indicator properties in mid-Atlantic soils as influenced by conservation management. *J. Soil Water Conserv.* Vol. 55, pp. 69-78.

**ISO 23753-1. 2002.** Draft (Enquiry Stage). Soil quality - determination of dehydrogenase activity in soils- Part 1: Method with TTC. International Organisation for Standardisation. Genève, Switzerland.

**Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., Steinberg, C. 2007.** Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 39, pp. 1-23.

**Lakay, F. M., Botha, A., Prior, B. A. 2006.** Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 102 (2007), pp. 265-273.

**Lal, R & Kimble, J. M. 1997.** Conservation tillage for carbon sequestration. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. Vol. 49, pp. 243-253.

**Lal, R. 2016.** Beyond COP21: Potential and challenges of the “4 per Thousand” initiative. *J. Soil Water Conserv.* Vol. 71, pp. 20<sup>a</sup>-25A.

**Lal, R. 2015.** Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. *Sustainability*. Vol. 7, pp. 5875-5895.

**Lal, R. 2009.** Soil degradation as a reason for inadequate human nutrition. *Food Sec.* Vol. 1, pp. 45-57.

**Lal, R. 2018.** Sustainable intensification of China's agroecosystems by conservation agriculture. *International Soil and Water Conservation Research*. Vol. 6, pp. 1-12.

**Li, J., Zhao, B., Li, X., Jiang, R., So, H. B. 2008.** Effects of Long-Term Combined Application of Organic and Mineral Fertilizers on Microbial Biomass, Soil Enzyme Activities and Soil Fertility. *Agricultural Sciences in China*. Vol. 7(3), pp. 336-343.

**LQARS., INIAV- Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva-. 2006.** *Manual de fertilização das culturas*. Tapada da Ajuda : s.n., 2006. Apartado 3228-1301-903.

**Magdoff, F. & van Es, H. 2009.** Building soils for better crops (3rd ed., Vol. 4). Sustainable Agriculture Research and Education (SARE) program, USDA. United States of America. <https://www.sare.org/Learning-Center/Books/Building-Soils-for-Better-Crops-3rd-Edition>.

**Mangalassery, S., Mooney, S. J., Sparkes, D. L., Fraser W. T., Sjogersten, S. 2015.** Impacts of zero tillage on soil enzyme activities, microbial characteristics and organic matter functional chemistry in temperate soils. *European Journal of Soil Biology*. Vol. 68, pp. 9-17.

**Manlay, R. J., Feller, C., Swift, M. J. 2007.** Historical evolution of soil organic matter concepts and their relationships with the fertility and sustainability of cropping systems. *Agriculture Ecosystems and Environment*. Vol. 119, pp. 217-233.

**Marinari, S., Mancinelli, R., Campiglia, E., Grego, S. 2006.** Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy. *Ecol. Indic.* Vol. 6, pp. 701-711.

**Mbuthia, L. W., Acosta-Martínez, V., DeBruyn, J., Schaeffer, S., Tyler, D., Odoi, E., Mpheshea, M., Walker, F. 2015.** Long term tillage, cover crop, and fertilization effects on microbial community structure activity: Implications of soil quality. *Soil Biology and Biochemistry.* Vol. 89, pp. 24-34.

**Mercali, C. A. 2011.** Estudo do perfil fitoquímico, nutricional e atividades biológicas do broto de girassol (*Helianthus annuus* L.). Curitiba. Universidade Federal do Paraná.

**Merelo, S., López-Bellido, R. J., López-Bellido, L., Muñoz-Romero, V., Moreno, F., Murillo, J. M. 2011.** Long-term effect of tillage, rotation and nitrogen fertiliser on soil quality in a Mediterranean Vertisol. *Soil & Tillage Research.* Vol. 114, pp. 97-107.

**Morales, J. A. 1993.** Sedimentología del Estuário del Guadiana (SW Espana–Portugal). PhD thesis, University of Sevilla, Spain.

**Moreira, D. 1998.** Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res.* Vol. 26, pp. 3309-3310.

**Nair, H. P., Vincent, H., Bhat, S. G. 2014.** Evaluation of five in situ lysis protocols for PCR amenable metagenomic DNA from mangrove soils. *Biotechnology Reports.* Vol. 4, pp. 134-138.

**Nivelle, E., Verzeaux, J., Habbib, H., Kuzyakov, Y., Decocq, G., Roger, D., Lacoux, J., Duclercq, J., Spicher, F., Nava-Saucedo, J., Catterou, M., Dubois F., , Tetu, T. 2016.** Functional responde of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization. *Applied Soil Ecology.* Vol. 108, pp. 147-155.

**Nortcliff, S. 2002.** Standardisation of soil quality attributes. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* Vol. 88, pp. 161–168.

**Oades, J.M. 1988.** The retention of organic matter in soils. *Biogeochemistry.* Vol. 5, pp. 35-70.

**Ovreas, L., Torsvik, V.V. 1998.** Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbiol. Ecol.* Vol. 36, pp. 303-315.

**Palma, P., Ledo, L., Soares, S., Barbosa, I. R., Alvarenga, P. 2014.** Spatial and temporal variability of the water and sediments quality in the Alqueva reservoir

(Guadiana Basin; southern Portugal). *Science of The Total Environment*, 470–471, 780-790. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.035>

**Pennanen, T., Paavolainen, L., Hantula, J. 2001.** Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 33, pp. 697-699.

**Pierzynski, G. M., Sims, J. T., Vance, G. F. 1994.** "Soils and environmental quality," Lewis Publishers, Florida.

**Riehm, H. 1958.** Die ammoniumlaktatessigsäure-methode zur bestimmung der leichtlöslichen phosphorsäure in karbonathaltigen boden. *Agrochimica*. Vol. 3, pp. 49-65.

**Robinson, D., et al. 2012.** Soil Natural Capital and Ecosystem Service Delivery in a World of Global Soil change. *Soils Food Secur.*

**Rogers, S. O & Bendich, A. J. 1994.** Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. *Plant molecular biology manual*, pp. 183– 190. Dordrecht: Springer.

**Roose-Amsaleg, C. L., Garnier-Sillam, E., Harry, M. 2001.** Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl Soil Ecol.* Vols. 18, , pp. 47-60.

**Sagar, K., Singh, S. P., Goutam, K. K., Konwar, B. K. 2014.** Assessment of five soil DNA extraction methods and a rapid laboratory-developed method for quality soil DNA extraction for 16S rDNA-based amplification and library construction. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 97, pp. 68-73.

**Sainjul, U. M., Sing, B. P., Whitehead, W. F., Wang, S. 2006.** Carbon supply and storage in tilled and nontilled soil as influenced by cover crops and nitrogen fertilization. *J. Environment*. Vol. 35, pp. 1507-1517.

**Sambrook, J., Fritschi, E. F., Maniatis, T. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. *Spring*.

**Sánchez-Moreno, S & Ferris, H. 2007.** Suppressive service of the soil food web: effects of environmental management. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. Vol. 119, pp. 75-87.

**Sardans, J., Peñuelas, J., Estiarte M. 2008.** Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Applied Soil Ecology*. Vol. 39., pp. 223-235.

**Satyanarayana, S. D. V., Krishna, M. S. R., Kumar, P. P. 2017.** Optimization of high-yielding protocol for DNA extraction from the forest rhizosphere microbes. *Cross Mark. 3 Biotech.* Vol. 91, pp. 1-9.

**Schlatter, D., Kinkel, L., Thomashow, L., Weller, D., Paulitz, T. 2017.** Disease suppressive soils: new insights from the soil microbiome. *Phytopathology.* Vol. 107., pp. 1284-1297.

**Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J. C. 2003.** Indicators for evaluating soil quality. . *Agriculture, Ecosystems and Environment.* Vol. 98, pp. 255-262.

**Schwilch, G., Bernet, L., Fleskens, L., Giannakis, E., Leventon, J., Marañón, T., Mills, J., Short, G., Stolte, J., van Delden, H., Verzandvoort, S. 2016.** Operationalizing ecosystem services for the mitigation of soil threats: A proposed framework. *Ecological Indicators.* Vol. 67., pp. 586-597.

*Seminário Gestão Sustentável do Solo: Linhas de orientação. DGADR, INIAV-I.P. 2017.* Oeiras : s.n., 2017. Conclusões. pp. 1-12.

**Sharma, S., Sharma, K. K., Kuhad, R. C. 2013.** An efficient and economical method for extraction of DNA amenable to biotechnological manipulations, from diverse soils and sediment. *Journal of Applied Microbiology.* Vol. 116, pp. 923-933.

**Sinsabaugh, R. L. 2010.** Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology & Biochemistry.* Vol. 42, pp. 391-404.

**Smets, W., Leff, J. W., Bradford, M. A., McCulley, R. L., Lebeer, S., Fierer, N. 2016.** A method for simultaneous measurement of soil bacterial abundances and community composition via 16S rRNA gene sequencing. *Soil Biology & Biochemistry.* Vol. 96, pp. 145-151.

**Tabatabai, M. A. 1982.** Soil Enzymes. In Page, A. L., Baker, D. E., Rosco, E., Ellis, J., Keeney, D. R., Miller, R. H. & J. D. Rhoades (Ed.), *Methods of soil analysis, Part 2, chemical and microbiological properties*, (2nd ed.) (903-943). Madison: American Society of Agronomy, Inc. e Soil Science Society of America.

**Tanveer, A., Yadav, S., Yadav, D. 2016.** Comparative assessment of methods for metagenomic DNA isolation from soils of different crop growing fields. *CrossMark. 3 Biotech.* Vol. 220, pp. 1-5.

**Tisdall, J. e Oades, J. 1982.** Organic-matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.*



**Truu, A. M. 2008.** Impacto of land use on microbial communities in Estonian soil.

**Turco, R. F., Kennedy, A. C, Jawson, M. D. 1994.** Microbial indicators of soil quality. In: Doran, J. W., Coleman, D. C., Bezdicek, D. F., Steward, B. A. Defining Soil Quality For a Sustainable Environment. SSSA (Soil Science Society of America), pp. 73-90. Madison

United States Department of Agriculture (USDA). data desconhecida. Soil health. Acedido em : <http://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/main/soils/health/>, acedido em: 23/07/2019.

**van Diepeningen, A. D., de Vos, O.J., Korthals, G. W., van Bruggen, A. H. C. 2006.** Effect of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *Appl. Soil Ecol.* Vol. 31, pp. 120-135.

**Verma, S. K., Singh, H., Sharma, P. C. 2017.** An improved method suitable for isolation of high-quality metagenomic DNA from diverse soils. *CrossMark. 3 Biotech.* Vol. 171, pp. 1-7.

**Walkley, A & Black, J. A. 1934.** An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* Vol. 37, pp. 29-38.

**Weil, R., Brady, N.C. 2017.** *The Nature and Properties of Soils*. Fifteenth Edition Global Edition. Harlow : ed. Pearson.

**West, O. T & Six, J. 2007.** Considering the influence of sequestration duration and carbon saturation on estimates of soil carbon capacity. *Climatic Change.* Vol. 80, pp. 25-47.

**Yakovchenko, V., Sikora, L. J., Kaufman D. D. 1996.** A biologically based indicator of soil quality. *Biol Fertil Soils.* Vol. 21, pp. 245-251.

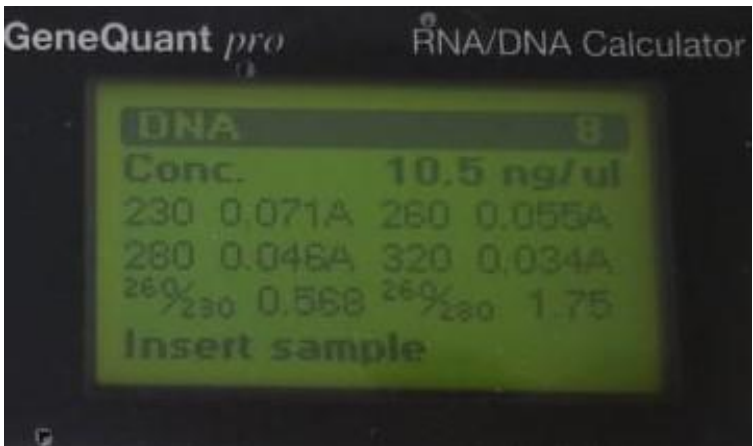
**Zielińska, S., Radkowski, P., Blendowska, A., Ludwig-Gałęzowska, A., Łoś, J. M., Łoś, M. 2016.** The choice of the DNA extraction method may influence the outcome of the soil microbial community structure analysis. *Wiley MicrobiologyOpen.* pp. 1-11.

**Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M. 1996.** DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol.* Vol 62, pp. 316–322.

**ANEXO A - Gráficos das leituras de absorvância dos extratos das amostras de solo (230-320 nm)**



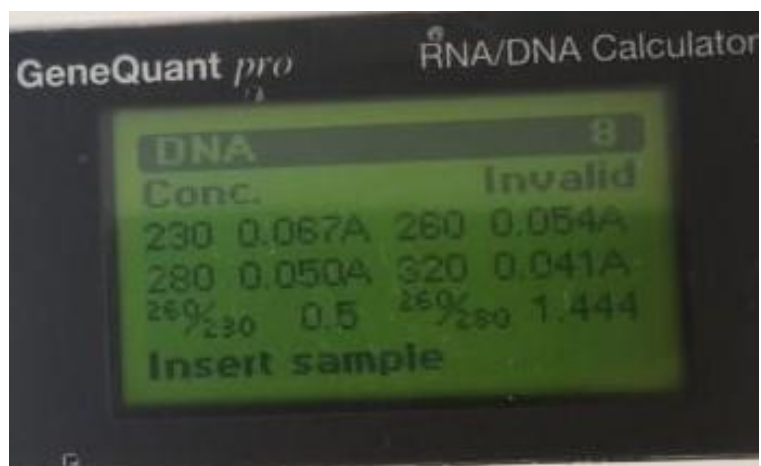
**Figura A.0.1-** Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra A\_V



**Figura A.0.2-** Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da amostra A\_V



**Figura A.0.3-** Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra B\_V\_1



**Figura A.0.4-** Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da B\_V\_1



**Figura A.0.5-** Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra B\_V\_2



**Figura A.0.6-** Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da amostra B\_V\_2



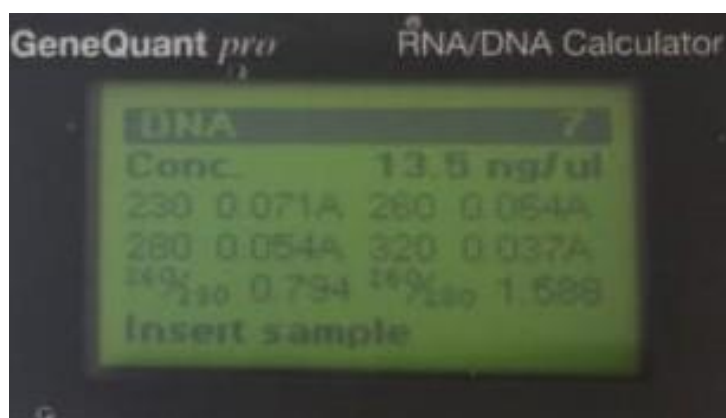
**Figura A.0.7-** Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra C\_V



**Figura A.0.8-** Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da amostra C\_V



**Figura A.0.9-** Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra A\_G\_1



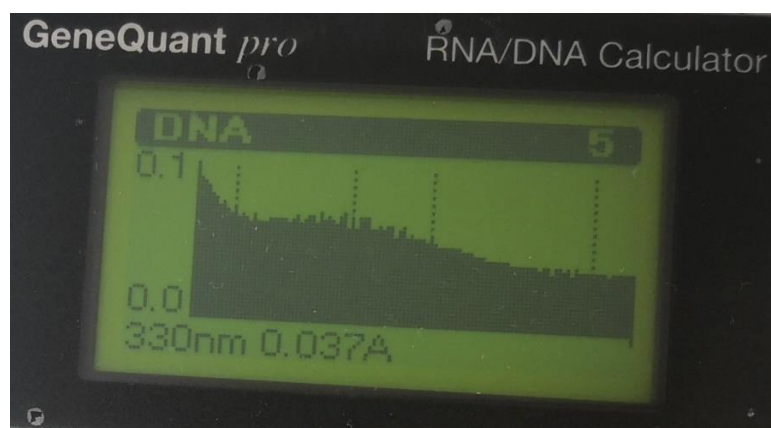
**Figura A.0.10-** Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da A\_G\_1



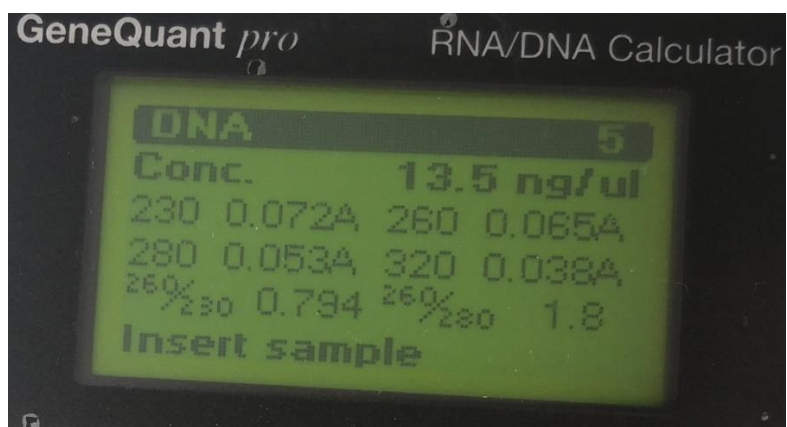
**Figura A.0.11-** Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra A\_G\_2



**Figura A.0.12-** Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da amostra A\_G-2



**Figura A.0.13-** Curva de absorvância de 220 a 320 nm do extrato da amostra A\_G\_3.



**Figura A.0.14-** Valores de absorvância a 230, 260, 280 e 320 nm para o extrato da amostra A\_G\_3.